

Université de Montréal

***Pratylenchus alleni* : son spectre d'hôtes, sa reproduction dans un contexte de changements climatiques
et sa quantification par PCR quantitative**

par

Myriam Vandal

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des arts et sciences

en vue de l'obtention du grade de maître ès (M.Sc.)

en sciences biologiques

Janvier 2017

© Myriam Vandal, 2017

Résumé

Au Canada, les pertes de rendement en agriculture attribuées aux nématodes sont généralement associées aux nématodes des lésions du genre *Pratylenchus*. En 2011, la découverte d'une nouvelle espèce exotique au Canada et qualifiée de rare dans le Nord-Est américain, soit *Pratylenchus alleni* Ferris, a soulevé de nouvelles inquiétudes. Afin de déterminer si cette espèce représente une menace pour les productions agricoles du Québec, mon projet de maîtrise visait à recueillir des informations sur sa virulence. Dans un premier temps, le spectre d'hôtes de *P. alleni* a été étudié et les résultats ont montré que ce nématode se développe très bien sur la pomme de terre, mais non sur la luzerne et le trèfle rouge. Ensuite, la reproduction de *P. alleni* dans un contexte de changements climatiques a été étudiée. L'augmentation prévue des températures et CO₂ devrait favoriser le développement de *P. alleni* puisqu'il possède un meilleur taux de reproduction sur le soya lorsque soumis à un régime de températures de 17/28 °C et à une concentration en CO₂ de 1200 ppm comparativement à 12/23 °C (400 ppm) et 15/26 °C (800 ppm). Dans cette même étude, une réduction de 19 à 58 % du poids sec racinaire des plants de soya inoculés avec *P. alleni* a été observée comparativement aux plants témoins. De plus, une méthode moléculaire de détection et de quantification simultanée de *P. alleni* et *P. penetrans*, l'espèce de *Pratylenchus* la plus répandue dans l'Est canadien, par qPCR a également été développée. Pour chacune des deux espèces, une sonde TaqMan associée avec le fluorophore CY5 pour *P. alleni* et FAM pour *P. penetrans* ciblant la région D2/D3 de la grande sous-unité ribosomale (28S) ont été développées et celles-ci se sont avérées spécifiques à chaque espèce. Ces résultats amènent de nouvelles connaissances sur ce ravageur et mettent en lumière sa pathogénicité.

Mots-clés

Nématode des lésions, *Pratylenchus alleni*, changements climatiques, spectre d'hôtes, qPCR, soya, taux de reproduction, *Pratylenchus penetrans*

Abstract

In Canada, yield losses attributed to nematodes are generally associated with root-lesion nematodes from the genus *Pratylenchus*. In 2011, a new exotic species was detected in Canada and identified as *Pratylenchus alleni* Ferris. *Pratylenchus alleni* is rare in the Northeastern U.S. and its discovery has raised new concerns. To determine whether this species is a threat to agricultural production in Québec, my project aims to collect information about its pathogenicity. First, the host range of *P. alleni* was studied and the results showed that the nematode was developing well on potato, but poorly performed on alfalfa and red clover. The reproduction of *P. alleni* has also been studied in a context of climate change. The results showed that anticipated temperature and CO₂ increases should favor *P. alleni* since it has a better reproduction rate on soybeans subjected to a night/day temperature regime of 17/28°C and a CO₂ concentration of 1200 ppm compared to 12/23°C (400 ppm) and 15/26°C (800 ppm) regimes. In the same study, a reduction of 19 to 58 % of roots dry weight of soybeans inoculated with *P. alleni* was observed compared to control plants. A simultaneous molecular detection and quantification method by qPCR of *P. alleni* and *P. penetrans*, the most widespread *Pratylenchus* species in Eastern Canada, was also developed. For each species, a TaqMan probe associated with the CY5 fluorophore for *P. alleni* and FAM for *P. penetrans* targeting the D2/D3 expansion segments of the large ribosomal subunit (28S) were developed and proved to be specific to each species. These results bring new insights into this new pest and highlight its pathogenicity.

Keywords

Root-lesion nematodes, *Pratylenchus alleni*, climate change, host range, qPCR, soybean, reproduction rate, *Pratylenchus penetrans*

Table des matières

Résumé.....	i
Mots-clés.....	i
Abstract	ii
Keywords	ii
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Chapitre 1 : Introduction générale.....	1
1.1 Mise en contexte	1
1.2 Revue de littérature.....	2
1.2.1 Changements climatiques : prévisions d'ici 2100	2
1.2.2 Impacts des changements climatiques sur l'agriculture.....	4
1.2.3 Effets des changements climatiques sur le phénomène d'invasion d'une espèce exotique.....	6
1.2.4 Effets de l'augmentation des températures sur les nématodes.....	8
1.2.5 Enrichissement en CO ₂ atmosphérique et interactions plantes-nématodes	8
1.2.6 Le genre <i>Pratylenchus</i>	10
1.2.7 Biologie générale des <i>Pratylenchus</i>	11
1.2.8 Distribution géographique et principaux hôtes de <i>Pratylenchus alleni</i> et <i>Pratylenchus penetrans</i>	12
1.2.9 Influence du type de sol sur les espèces du genre <i>Pratylenchus</i>	13
1.2.10 Effet de la température sur le développement et la reproduction de <i>Pratylenchus alleni</i> et <i>Pratylenchus penetrans</i>	15
1.2.11 Impact économique de <i>Pratylenchus alleni</i> et <i>Pratylenchus penetrans</i>	16
1.2.12 Moyens de lutte contre les espèces du genre <i>Pratylenchus</i>	18
1.2.13 Détection et quantification moléculaire des <i>Pratylenchus</i> spp. par qPCR.....	20
1.2.14 Principes théoriques de la qPCR	21
1.2.14.1 Technologies de détection	22
1.2.14.2 Les stratégies de quantification : quantification absolue et relative.....	24
1.2.14.3 Structure de l'ADN ribosomique des nématodes.....	25

1.3 Objectifs	27
---------------------	----

1.4 Hypothèses.....	27
---------------------	----

Chapitre 2 : <i>Pratylenchus alleni</i> : plantes hôtes potentielles et importance de la texture du sol sur sa reproduction.....	28
--	----

2.1 Résumé.....	28
-----------------	----

2.2 Introduction.....	29
-----------------------	----

2.3 Matériel et méthodes	30
--------------------------------	----

2.4 Résultats	38
---------------------	----

2.5 Discussion	40
----------------------	----

2.6 Conclusion	44
----------------------	----

Chapitre 3 : Reproduction de <i>Pratylenchus alleni</i> sur trois cultivars de soya dans un contexte de changements climatiques	45
---	----

3.1 Résumé.....	45
-----------------	----

3.2 Introduction.....	46
-----------------------	----

3.3 Matériel et méthodes	47
--------------------------------	----

3.4 Résultats	51
---------------------	----

3.5 Discussion	54
----------------------	----

3.6 Conclusion	57
----------------------	----

Chapitre 4 : Détection et quantification des nématodes des lésions <i>Pratylenchus alleni</i> et <i>P. penetrans</i> par PCR quantitative.....	58
--	----

4.1 Résumé.....	58
-----------------	----

4.2 Introduction.....	59
-----------------------	----

4.3 Matériel et méthodes	60
--------------------------------	----

4.4 Résultats	72
---------------------	----

4.5 Discussion	82
----------------------	----

4.6 Conclusion	84
Chapitre 5 : Discussion générale et conclusion	85
5.1 Résumé des principaux résultats	86
5.2 Applications et perspectives futures	88
Bibliographie.....	91

Liste des tableaux

Tableau I: Évolution de la température moyenne à la surface du globe et des concentrations en équivalents de CO₂ atmosphérique par rapport à la période de référence 1986-2005 (GIEC, 2014).

Tableau II: Distribution mondiale de *Pratylenchus alleni*.

Tableau III: Distribution actuelle de *Pratylenchus alleni* en Amérique du Nord.

Tableau IV: Liste des plantes utilisées pour le test d'hôtes potentiels de *Pratylenchus alleni*.

Tableau V: Classification des trois types de sol sélectionnés selon une analyse granulométrique pour déterminer l'influence du type de sol sur la reproduction du nématode des lésions *Pratylenchus alleni*.

Tableau VI: Densité de population finale de *Pratylenchus alleni* et poids secs racinaires mesurés sur le soya cv. P90Y90 dans trois types de sol 90 jours suivant l'inoculation.

Tableau VII: Densité de population finale de *Pratylenchus alleni* et poids secs racinaires mesurés sur le maïs cv. Extra Early Super Sweet dans trois types de sol 90 jours suivant l'inoculation.

Tableau VIII: Caractéristiques des cultivars de soya sélectionnés.

Tableau IX: Régimes climatiques des trois cabinets de croissance.

Tableau X: Densités de population finale/g de racines sèches pour chacun des trois cultivars dans chaque régime climatique.

Tableau XI: Poids secs racinaires des plants témoins et des plants inoculés avec *P. alleni* et le pourcentage de diminution des poids secs racinaires pour chacun des trois cultivars de soya dans chacun des trois régimes climatiques.

Tableau XII: Différences entre les poids secs des racines des plants de soya témoins et inoculés avec *P. alleni* soumis aux régimes climatiques.

Tableau XIII: Liste des espèces de *Pratylenchus* utilisées pour les alignements *in silico* et leur numéro d'accèsion de GenBank (NCBI).

Tableau XIV: Séquences des amorces et sondes développées pour *Pratylenchus alleni* et *P. penetrans*.

Tableau XV: Séquences des amorces et de la sonde permettant l'amplification et la détection du contrôle interne.

Tableau XVI: Cycle thermique d'amplification au qPCR en SYBR green pour générer une courbe de dissociation.

Tableau XVII: Cycle thermique d'amplification au qPCR avec sonde TaqMan.

Tableau XVIII: Calculs des dilutions en série des oligonucléotides synthétiques de *P. alleni* et *P. penetrans*.

Tableau XIX: Variabilité intra-essai de la courbe standard synthétique de *P. alleni* basée sur la moyenne et l'écart-type des Cq et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Tableau XX: Variabilité intra-essai de la courbe standard synthétique de *P. penetrans* basée sur la moyenne et l'écart-type des Cq et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Tableau XXI: Variabilité inter-essais de la courbe standard synthétique de *P. alleni* basée sur la moyenne et l'écart-type et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Tableau XXII: Variabilité inter-essais de la courbe standard synthétique de *P. penetrans* basée sur la moyenne, l'écart-type et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Tableau XXIII: Valeurs moyennes des Cq de 100 adultes de *P. alleni*, 100 adultes de *P. penetrans* et 2000 copies du contrôle interne en simplexe et en multiplexe.

Liste des figures

Figure 1: Effets des changements climatiques sur le phénomène d'invasion chez une espèce exotique. Source : d'après Walther *et al.* (2009).

Figure 2: Conséquences d'une concentration en CO₂ atmosphérique élevée sur les interactions plante-nématode et la productivité des plantes (traduit de Somasekhar et Prasad, 2012).

Figure 3: Taux de multiplication (population finale/population initiale) de *P. alleni* et *P. penetrans* sur des racines de soya dans un loam sableux après 75 jours de croissance pour différentes températures. Source : d'après les résultats d'Acosta et Malek (1979).

Figure 4: Courbe d'amplification qPCR typique d'une séquence ADN cible marquée par une sonde fluorescente (D'après Sigma qPCR Technical Guide, Sigma-Aldrich, 2008).

Figure 5: Courbes d'émission de fluorophores communs (Tirée de Sigma qPCR Technical Guide, Sigma-Aldrich, 2008).

Figure 6: Structure générale de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes (D'après Hillis et Dixon, 1991).

Figure 7: Schéma de la technique d'extraction de l'assiette de Baermann.

Figure 8: Méthode d'extraction de la chambre à brouillard.

Figure 9: Densités de population finale (Pf) moyennes ($\bar{x} \pm$ erreur-types) de *Pratylenchus alleni* sur huit cultures estimées 90 jours suivant l'inoculation de 2000 nématodes. Pour une même répétition, les données suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$) selon le test de comparaisons multiples de Duncan.

Figure 10: Alignements multiples des séquences D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S) de neuf espèces de *Pratylenchus*. Les amorces et la sonde de *P. alleni* sont identifiées dans les encadrés. Les points représentent des nucléotides identiques à la séquence de référence, soit *P. alleni* et les tirets représentent des brèches ou *gaps* (en anglais).

Figure 11: Alignements multiples des séquences D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S) de neuf espèces de *Pratylenchus*. Les amorces et la sonde de *P. penetrans* sont identifiées dans les encadrés. Les points représentent des nucléotides identiques à la séquence de référence, soit *P. penetrans* et les tirets représentent des brèches ou *gaps* (en anglais).

Figure 12: Dispositif expérimental pour l'association du nombre de nématodes à un nombre de copies. Les sections en bleu représentent les trois réplicats techniques des points de dilution D4 à D7. Les sections en brun représentent les trois réplicats biologiques des cinq points de la courbe en nombre de nématodes.

Figure 13: Courbes de dissociation (dérivé primaire de la fluorescence en fonction de la température) montrant l'amplification spécifique de *P. allenii* soumise à une température d'appariement de 62°C (Trois réplicats techniques).

Figure 14: Courbes de dissociation (dérivé primaire de la fluorescence en fonction de la température) montrant l'amplification spécifique de *P. penetrans* soumise à une température d'appariement de 62°C (Trois réplicats techniques).

Figure 15: Exemple de l'étalement des courbes standards génomiques et synthétiques de *P. penetrans*. La courbe bleue représente les trois réplicats techniques de la courbe synthétique (D4 à D7). La courbe noire représente les trois réplicats biologiques de 5, 10, 25, 50, 100 nématodes.

Figure 16: Courbe standard pour la quantification absolue de *P. allenii* ($\bar{x} \pm \text{écart-types des Cq}$) (n=3).

Figure 17: Courbe standard pour la quantification absolue de *P. penetrans* ($\bar{x} \pm \text{écart-types des Cq}$) (n=3).

Figure 18: Relation entre le nombre de *P. allenii* dénombré à la loupe binoculaire et le nombre estimé par qPCR.

Figure 19: Relation entre le nombre de *P. penetrans* dénombré à la loupe binoculaire et le nombre estimé par qPCR.

Liste des sigles et abréviations

°C : degré Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNr : ADN ribosomique

ANOVA : analyse de la variance

atm. : atmosphérique

BSA : albumine de sérum bovin

C : carbone

CC : changements climatiques

CO₂ : dioxyde de carbone

Cq : cycle de quantification

ddl : degrés de liberté

E : efficacité d'un courbe standard

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

eq. : équivalent

ES : erreur-type

ET : écart-type

et al. : et autres

g : gramme

GES : gaz à effet de serre

GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat

ITS : *internal transcribed spacer*/ espaceur interne transcrit

J2 : deuxième stade juvénile

J3 : troisième stade juvénile

J4 : quatrième stade juvénile

kg : kilogramme

L : litre

LOD : limite de détection

LSU : grande sous-unité ribosomale

mL : millilitre

N : azote

n : taille de l'échantillon

NKS : nématode à kyste du soya

nM : nanomolaire

PCR : réaction en chaîne par polymérase

Pf : population finale

Pi : population initiale

ppm : partie par million

pb : paire de bases

qPCR : réaction en chaîne par polymérase en temps réel/ PCR quantitative

R : facteur de reproduction

R² : coefficient de détermination

RCP : *Representative Concentration Pathways*

spp. : espèces

SSU : petite sous-unité ribosomale

TE : Tris-EDTA

μL : microlitre

W : watt

Remerciements

Cette maîtrise de recherche a été réalisée à l'aide du programme des adjoints de recherche (PAR) du gouvernement fédéral du Canada. Elle a été réalisée au Centre de recherche et développement de Saint-Jean-sur-Richelieu d'Agriculture et d'Agroalimentaire Canada, à Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec, Canada.

Tout d'abord, je remercie mes directeurs de recherche Benjamin Mimee et Jacques Brodeur qui m'ont guidé et conseillé tout au long de ma maîtrise.

Je tiens également à remercier Guy Bélair pour m'avoir permis de découvrir la nématologie en me prenant comme stagiaire lors de mon baccalauréat et pour ses précieux conseils.

Merci aux meilleurs techniciens de laboratoire Nathalie Dauphinais, Pierre-Yves Véronneau et Éléonore Tremblay qui ont travaillé sur les projets avec moi. Merci aussi aux incroyables étudiants gradués et stagiaires pour leur aide.

Finalement, je remercie mon conjoint Guillaume qui a su me motiver et m'encourager tout au long de mes études.

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 Mise en contexte

Les changements climatiques (CC) représentent un phénomène naturel qui se produit depuis toujours, mais le réchauffement graduel accéléré et l'augmentation de la sévérité et de la fréquence des événements extrêmes observés lors des dernières décennies résultent principalement de l'amplification des émissions de gaz à effet de serre engendrées par les activités anthropiques (Somasekhar et Prasad, 2012). L'altération de ces paramètres climatiques est à l'origine de nombreux bouleversements en agriculture. En effet, l'augmentation des températures et des événements extrêmes (p. ex. sécheresses et précipitations) pourrait exacerber les problèmes phytosanitaires causés par les phytoparasites de plusieurs façons, par exemple, par l'expansion de leurs aires de répartition géographique et par l'augmentation de leur nombre de générations par saison (Boag *et al.*, 1991; Baker *et al.*, 2000; Bebber, 2015).

Au Canada, le nématode *Pratylenchus alleni* Ferris a été détecté pour la première fois en 2011 sur la culture de soya (*Glycine max* (L.) Merr.) dans le sud-ouest du Québec (Bélair *et al.*, 2013). Comme la température optimale de croissance de ce nématode est supérieure à celle de l'espèce indigène très apparentée *Pratylenchus penetrans* (Cobb) Filip. & Stek., présente dans toutes les régions agricoles du Québec, il est plausible que les CC favoriseront l'établissement de *P. alleni* dans de nouvelles régions agricoles (Acosta et Malek, 1979). Il est dès lors important de se questionner sur l'impact qu'aura cette nouvelle introduction sur les

agroécosystèmes de l'Est canadien et les conséquences sur les cultures de très grande importance économique, tel le soya et le maïs. Au Canada, la production du soya et du maïs couvre un peu plus de 3 500 000 hectares, une zone que *P. alleni* pourrait exploiter et y causer de sévères dommages (Statistique Canada, 2015). En 2011, les pertes de rendement causées par *P. alleni* variaient de 38 à 54 % dans les zones infestées d'un champ de soya, en comparaison avec les parcelles asymptomatiques voisines (Bélair *et al.*, 2013). Ces pertes de rendement témoignent du pouvoir pathogène de cette espèce sur la culture du soya et soulignent l'importance d'une meilleure gestion des espèces du genre *Pratylenchus*.

1.2 Revue de littérature

1.2.1 Changements climatiques : prévisions d'ici 2100

Les changements climatiques représentent l'un des enjeux environnementaux les plus importants à ce jour. Ils résultent, en majeure partie, de l'augmentation de la concentration des gaz à effets de serre (GES) de l'atmosphère qui emprisonnent la chaleur près de la surface du globe. Afin d'analyser l'évolution du climat dans le futur, les scientifiques s'appuient sur des scénarios socio-économiques d'émissions de GES. Ces scénarios prennent en compte l'évolution de nombreux facteurs dont la démographie, l'économie et le développement industriel. Le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC), reconnu par la communauté scientifique, propose des scénarios décrivant l'évolution de la concentration en CO₂ et des températures de surface aux moyens de quatre profils appelés RCP pour *Representative Concentration Pathways*. Les scénarios (2.6, 4.5, 6.0 et 8.5) sont

nommés selon le forçage radiatif, la différence entre l'énergie radiative reçue et celle émise par un système climatique, estimé en 2100. Par exemple, le scénario 2.6 correspond à un forçage radiatif de +2.6 W/m². Ainsi, plus un forçage positif est élevé plus il tend à réchauffer un système climatique donné. Selon ces profils RCP, les projections de réchauffements climatiques que présente le GIEC dans son cinquième rapport (2014) indiquent que, d'ici 2065, la température moyenne de surface de la planète pourrait augmenter d'environ 1 à 2°C, avec une plus grande augmentation pour les plus hautes latitudes de l'hémisphère nord, et que la concentration en CO₂ atmosphérique pourrait doubler. Sur une plus longue période, soit d'ici 2100, la température de surface devrait augmenter de 1,5 à 4,9°C selon les scénarios et les concentrations en CO₂ devraient plus que doubler (Tableau I) (GIEC, 2014; Ouranos, 2015).

Tableau I: Évolution de la température moyenne à la surface du globe et des concentrations en équivalents de CO₂ atmosphérique par rapport à la période de référence 1986-2005 (GIEC, 2014).

Scénarios RCP	Concentration moyenne de CO ₂ -éq. prévue pour 2100 (ppm CO ₂ -éq.)	Réchauffement moyen mondial pour la période 2046-2065 p/r à 1986-2005 (°C)	Réchauffement moyen mondial pour la période 2081-2100 p/r à 1986-2005 (°C)
2.6	490	+1,0	+1,5
4.5	650	+1,4	+2,4
6.0	860	+1,3	+3,0
8.5	1370	+2,0	+4,9

Ces changements climatiques auront des répercussions importantes sur le fonctionnement et la structure des écosystèmes notamment sur la distribution, la biologie et le comportement de certains organismes (Garrett *et al.*, 2006; Polley, 2015). Dans les paragraphes suivants, les impacts des CC sur l'agriculture, les impacts de l'augmentation en CO₂ atmosphériques sur les

interactions plantes-nématodes et les impacts des augmentations de température sur les espèces exotiques seront abordés.

1.2.2 Impacts des changements climatiques sur l'agriculture

Le climat représente un des facteurs les plus déterminants des activités agricoles (Ouranos, 2010). Par exemple, les producteurs choisissent leurs cultivars et variétés en se basant sur le nombre de degrés-jours (mesure de l'accumulation de chaleur pour la saison de croissance) calculé pour leur région afin d'avoir des cultivars et variétés adaptés à leur climat offrant la meilleure productivité. Or, de nombreuses études ont montré les impacts des CC sur la croissance et la productivité des plantes (Thuzar *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2011). Dans les tropiques, les températures ambiantes prédites d'ici 2100 agiront comme un stress abiotique puisqu'elles atteindront et même dépasseront le seuil thermique maximal pour le développement, la reproduction et la photosynthèse des nombreuses plantes incluant le soya (Thuzar *et al.*, 2010; Lewis et Witham, 2012). Lorsque les températures excèdent ce seuil thermique maximal, les plantes répondent négativement par une réduction de leur croissance et du rendement (Das *et al.*, 2011). Au contraire, dans les régions tempérées, l'augmentation des températures engendrera une augmentation de la durée de la saison agricole avec une possibilité de compléter plus d'un cycle d'une même culture dans une même saison et une accélération du rythme de développement des plantes (Thuzar *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2011; Lewis et Witham, 2012; Osborne *et al.* 2013). Cependant, selon leur processus photosynthétique (C3 ou C4), les plantes ne répondent pas toutes de façon identique aux

variations du climat. Les plantes de type C3, comme le soya, répondent plus positivement que les plantes de type C4 à une augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique (Caswell *et al.*, 1973; Yamori *et al.*, 2014). Pour les C3, une augmentation de la concentration en CO₂ permettrait une hausse de rendement pouvant varier de 10 à 30 % et de 0 à 10% pour les C4 (Ainsworth et Long, 2005; Seguin, 2010). Chez les plantes en C3, cette hausse de rendement s'explique du fait que l'enzyme RubisCo, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase nécessaire pour la fixation du CO₂, n'est pas saturé avec la concentration actuelle de CO₂ atmosphérique, ainsi, une augmentation de la concentration globale en CO₂ stimulera la photosynthèse des plants C3 et la production de biomasse sera alors augmentée (Vu *et al.*, 2001; Ainsworth *et al.*, 2002; Deryng *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2014).

Spécifiquement dans les régions tempérées de l'Est canadien, les scénarios climatiques prévus d'ici 2100 prédisent un étalement de l'aire de distribution de nombreuses cultures vers des latitudes plus nordiques où les températures seront appropriées pour les cultures nécessitant des températures plus chaudes (Bootsma *et al.*, 2005; Ouranos, 2015). De ce fait, les CC vont augmenter le potentiel agronomique des cultures nécessitant une accumulation de chaleur plus élevée et une longue saison de croissance comme le soya et le maïs (Bootsma *et al.*, 2005). Dans l'Est canadien, la période végétative s'amorcera 11 jours plus tôt en moyenne pour les cultures de saisons chaudes et la période de fin de croissance se terminera 13 jours plus tard d'ici 2069 comparativement à la période de référence 1961-1990 (Qian *et al.*, 2013). À la lumière de ces informations, les modifications des régimes climatiques prévues dans un avenir rapproché dans l'Est canadien auront des répercussions importantes sur l'agriculture.

Cependant, ces modifications engendreront aussi des répercussions sur les espèces associées aux cultures. Ces répercussions seront abordées dans les paragraphes suivants avec une emphase sur les nématodes phytoparasites.

1.2.3 Effets des changements climatiques sur le phénomène d'invasion d'une espèce exotique

La modification de l'agriculture par les CC offre de nouvelles opportunités d'établissement d'espèces exotiques. Entre autres, il est probable que de nombreux ravageurs et pathogènes pourront s'établir dans de régions géographiques beaucoup plus nordiques et causer de nouveaux problèmes (DeLucia *et al.*, 2012; Lewis et Witham, 2012). Les CC peuvent rendre accessible de nouvelles régions à coloniser puisque les températures y sont plus propices à l'établissement de ces espèces. Ces températures propices augmenteront la performance de certaines espèces, favorisant ainsi leur établissement et leur capacité de dispersion (Walther *et al.*, 2009). Lorsqu'une espèce se retrouve à l'extérieure de son aire de répartition géographique naturelle connue et a un impact négatif sur les espèces indigènes ou sur l'écosystème, elle est considérée comme exotique dans ce nouvel habitat (Singh *et al.*, 2013a).

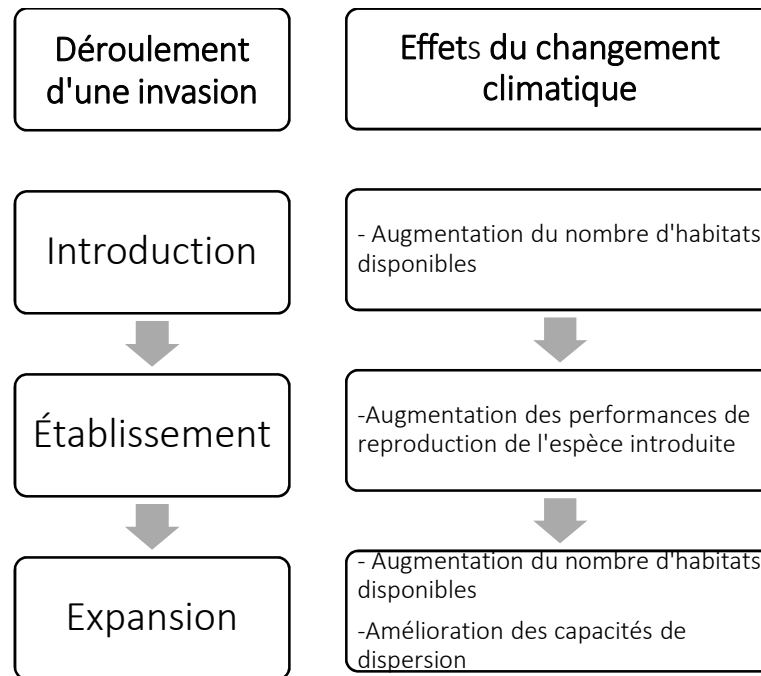


Figure 1: Effets des changements climatiques sur le phénomène d'invasion chez une espèce exotique. Source : d'après Walther *et al.* (2009).

L'invasion d'une espèce exotique se produit en trois étapes : l'introduction, l'établissement et l'expansion de l'aire de répartition (Figure 1). La première étape est généralement causée par des activités humaines permettant l'arrivée de l'espèce dans un nouvel habitat. À cette étape, les changements climatiques offrent de nouvelles opportunités d'introduction si les conditions climatiques du nouvel habitat sont similaires à celles de leur aire de répartition naturelle connue offrant ainsi une meilleure possibilité de survie. La deuxième étape, l'établissement, réfère au maintien durable d'une population dans cet habitat. Cette étape est très importante pour la gestion des espèces exotiques nuisibles puisque l'espèce demeure alors confinée à une seule région. Ce confinement limite ainsi la propagation de l'espèce exotique et ses effets nuisibles vers d'autres habitats. La dernière étape, quant à elle, permet à la population de

croître, favorisant ainsi l'extension de son aire de répartition vers de nouveaux habitats favorables (Walther *et al.*, 2009, Sauvion *et al.* 2013).

1.2.4 Effets de l'augmentation des températures sur les nématodes

Les poïkilothermes sont des organismes dont la température corporelle varie en fonction de la température extérieure. Les nématodes sont des organismes poïkilothermes et dépendent donc directement de la température extérieure pour réguler leur métabolisme. Les nématodes répondent habituellement à une augmentation des températures par une accélération de leur taux de développement, de leur potentiel reproductif et de leur nombre de générations par saison (DeLucia *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013a; Elad et Pertot, 2014). Par contre, chaque espèce possède une température maximale à laquelle correspond un taux de développement maximal. Au-delà de cette température, il se produit une inactivation des systèmes enzymatiques qui peut être létale (Demeure, 1978).

1.2.5 Enrichissement en CO₂ atmosphérique et interactions plantes-nématodes

L'impact direct du CO₂ sur les nématodes demeure très peu documenté. Par contre, l'impact indirect l'est davantage. Puisque le CO₂ atmosphérique constitue la principale source de carbone pour la photosynthèse des plantes, une variation de sa concentration altère la morphologie et la physiologie des plantes (Hunter, 2001; Terashima *et al.*, 2014). Une concentration élevée en CO₂ tend à augmenter les taux photosynthétiques et de croissance et à accroître la biomasse de la plante. Ainsi, il y a réduction de la qualité nutritionnelle de la plante en augmentant le ratio carbone : azote (C :N). Cette dilution de l'azote induit une

réponse indirecte sur les nématodes phytoparasites. Cette réponse se nomme alimentation compensatoire et implique que les nématodes consomment plus de tissus racinaires pour maintenir un même taux de croissance (Figure 2) (Somasekhar et Prasad, 2012; McKenzie *et al.*, 2013).

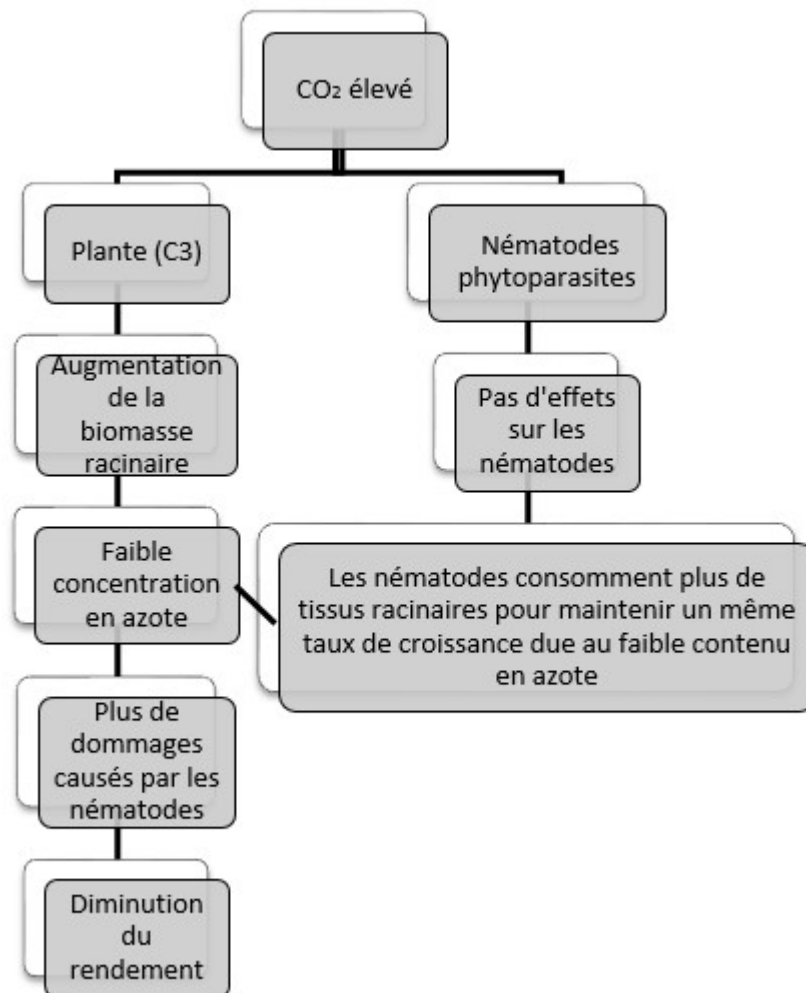


Figure 2: Conséquences d'une concentration en CO₂ atmosphérique élevée sur les interactions plante-nématode et la productivité des plantes (traduit de Somasekhar et Prasad, 2012).

1.2.6 Le genre *Pratylenchus*

Le terme nématode des lésions racinaires réfère au genre *Pratylenchus* qui inclut certains des plus importants ravageurs de nombreuses cultures à l'échelle mondiale. En fait, le genre *Pratylenchus* a été classé au troisième rang des nématodes phytoparasites les plus dévastateurs des cultures derrière les nématodes des nodosités (*Meloidogyne*) et les nématodes à kyste (*Heterodera* et *Globodera*) (Jones *et al.*, 2013). Environ 68 espèces de *Pratylenchus* sont actuellement répertoriées à travers le monde, mais seulement une douzaine causeraient des pertes économiques aux cultures (Castillo et Volvas, 2007). Au Canada, *Pratylenchus penetrans* représente l'espèce la plus répandue et la plus dévastatrice (Potter et McKeown, 2003; Yu, 2008).

Siddiqi (2000) propose la classification suivante des *Pratylenchus*:

Embranchement: Nematoda

Classe: Secernentea

Sous-classe: Tylenchia

Ordre: Tylenchida

Sous-ordre: Tylenchina

Superfamille: Hoplolaimoidea

Famille: Pratylenchidae

Sous-famille: Pratylenchinae

Genre: *Pratylenchus* Filipjev, 1936

1.2.7 Biologie générale des *Pratylenchus*

Les *Pratylenchus* sont des endoparasites migrants des racines. Ils perforent et pénètrent l'épiderme dans la zone d'élongation à l'aide de leur stylet et, une fois à l'intérieur, se déplacent jusqu'au cortex en s'alimentant des cellules qu'ils détruisent (Acosta et Malek, 1981; Zunke, 1990; Jones et Fosu-Nyarko, 2014). Ces déplacements intracellulaires occasionnent aux plantes hôtes une réduction de la croissance des racines et des nécroses profondes aux racines et radicelles. Ils prédisposent également la plante à des infections secondaires par des champignons et des bactéries par la création d'un site d'entrée lors du bris de l'épiderme (Castillo et Volvas, 2007; Moens et Perry, 2009). Lorsque la racine devient nécrotique, meurt ou devient défavorable à l'alimentation et la reproduction, le nématode se déplace à travers le cortex vers une région saine ou dans le sol vers une autre racine (Zunke, 1990). Tous les stades de vie peuvent parasiter les tissus de l'hôte (Moens et Perry, 2009).

Le cycle de vie des *Pratylenchus* comprend typiquement un stade œuf, quatre stades juvéniles nommés J1, J2, J3 et J4 et un stade adulte (mâle et femelle). Après la fertilisation des œufs, les femelles pondent dans les racines des plantes hôtes ou dans le sol à proximité des racines. Les J2 émergent des œufs après 1 à 3 semaines et ont trois mues avant de devenir adultes (Moens et Perry, 2009). La durée du cycle de vie des *Pratylenchus* varie considérablement, soit 3 à 8 semaines selon l'espèce, la plante hôte et les conditions environnementales. Des conditions favorables conduisent à un développement plus rapide et une augmentation du nombre de générations par saison (Jones *et al.*, 2013). À la fin de la saison des récoltes, les nématodes des lésions peuvent entrer en quiescence (anhydrobiose) et dessécher dans des conditions de

sécheresse et se réhydrater quand le sol redevient humide ou lorsque des plantes hôtes sont présentes à nouveau. Autant *P. alleni* que *P. penetrans* peuvent survivre à des conditions de sécheresse. Certains *P. penetrans* sont en mesure de survivre dans un état d'anhydrobiose réversible pour une période de plus d'un an (Townshend, 1984).

1.2.8 Distribution géographique et principaux hôtes de *Pratylenchus alleni* et *Pratylenchus penetrans*

Le nématode des lésions *P. alleni* a été découvert et décrit pour la première fois à Eldorado, Illinois, États-Unis, parasitant plusieurs cultivars de soya dans un même champ (Ferris, 1961). En Amérique du Nord, *P. alleni* est présent dans quelques états américains centraux et n'a été rapporté qu'une seule fois au Canada (Tableaux II et III) (Ferris, 1961; Townshend *et al.*, 1978; Robbins *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1989a; Robbins *et al.*, 1989b; Bélair *et al.*, 2013). Comme la majorité des espèces de *Pratylenchus*, *P. alleni* est polyphage et parasite, entre autres, le soya, la tomate, le maïs, la pomme de terre, le blé, l'avoine, la framboise et le tournesol (Hackney et Dickerson, 1975; Dikerson, 1979; Bernard et Keyserling, 1985, Wartman et Bernard, 1985; Doucet *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2013b). Au contraire, *P. penetrans* abonde aux États-Unis et au Canada (Townshend *et al.*, 1978; Bélair *et al.*, 2007). Il parasite plus de 350 plantes hôtes incluant des plantes ligneuses et des herbacées, dont plusieurs d'importance économique comme le maïs, le soya et la carotte (Thies *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2013b; Teklu *et al.*, 2016).

Tableau II: Distribution mondiale de *Pratylenchus alleni*.

Continent	Pays	Sources
Asie	Inde	Singh et Jain, 1984
	Turquie	Di Vito <i>et al.</i> , 1994
Europe	France	Van der Berg et Cadet, 1992
	Russie	Castillo et Volvas, 2007
Amérique du Nord	Canada	Bélair <i>et al.</i> , 2013
	États-Unis	Robbins <i>et al.</i> , 1989a; Robbins <i>et al.</i> , 1989b
Amérique du Sud	Argentine	Doucet <i>et al.</i> , 2005

Tableau III: Distribution actuelle de *Pratylenchus alleni* en Amérique du Nord.

Pays	Province/État	Sources
Canada	Québec	Bélair <i>et al.</i> , 2013
États-Unis	Illinois	Ferris, 1961
	Ohio	Brown <i>et al.</i> , 1980
	Iowa	Williams, 1982
	Arkansas	Robbins <i>et al.</i> , 1989a; Robbins <i>et al.</i> , 1989b
	Tennessee	Bernard, 1980
	Missouri	Niblack, 1992

1.2.9 Influence du type de sol sur les espèces du genre *Pratylenchus*

Le sol est composé de différentes tailles de particules (tels le sable, l'argile et le limon) et leur proportion relative définit la texture du sol qui, à son tour, détermine la taille des pores (Krupenikov *et al.*, 2011). Ainsi, la texture et la structure, qui fait référence à la façon dont les particules du sol sont disposées les unes par rapport aux autres et avec la matière organique, apportent des informations importantes sur les propriétés d'un sol et influencent de façon importante les nématodes qui s'y trouvent, car les mouvements de ces nématodes dépendent

de la porosité du sol, de la grosseur des particules, de l'épaisseur de la pellicule d'eau et de la capacité du sol à retenir l'humidité (Decker, 1989).

En 2011, *P. alleni* a été découvert au Canada dans un champ de soya au sol sableux (81% sable, 10% loam, 9% argile et 4% matières organiques) (Bélair *et al.*, 2013). C'est dans ce type de sol que les populations de *Pratylenchus* sont généralement les plus élevées et dans lequel les dommages sont les plus sévères (Seinhorst, 1965; Kable et Mai, 1968; Townshend, 1972; Florini *et al.*, 1987). Par contre, quelques études ont montré que certaines espèces de *Pratylenchus* se reproduisent mieux en sols argileux. Par exemple, la reproduction de *P. thornei* serait inhibée en sol sableux lors d'étés chauds et secs alors que la rétention d'humidité dans le sol argileux permettrait une reproduction plus élevée que dans le sable (Grandison et Wallace, 1974; Thompson *et al.*, 2010). Tout comme *P. thornei*, d'autres études ont montrées que *P. neglectus* et *P. helophilus* se reproduisent bien dans les sols lourds capables de retenir l'humidité dans des milieux chauds et secs (Seinhorst, 1959; Thompson *et al.*, 2010).

On peut conclure que les *Pratylenchus* possèdent des préférences pour certains types de sol et que ceux-ci ont un impact sur les performances des nématodes, mais qu'au final, les préférences sont davantage influencées par l'interaction du type de sol avec l'humidité du sol qui est relié avec le climat (Kable et Mai, 1968).

1.2.10 Effet de la température sur le développement et la reproduction de *Pratylenchus alleni* et *Pratylenchus penetrans*

Comme mentionné à la section 1.2.4, la température est un facteur abiotique limitant pour les nématodes, des organismes poïkilothermes qui dépendent de la température ambiante pour régir leur température corporelle et leurs activités métaboliques (Freckman et Caswell, 1985). La température affecte, entre autres, le cycle de vie, la reproduction, la survie, la migration et la pénétration des racines. Les réponses thermiques diffèrent selon les espèces (Acosta et Malek, 1979; Freckman et Caswell, 1985). Par exemple, la température optimale pour la reproduction sur le soya diffère chez *P. alleni* (30°C) et *P. penetrans* (25°C) (Figure 3) (Acosta et Malek, 1979). Les réponses à la température peuvent aussi varier dans une même population (thermotype) (Daulton et Nusbaum, 1961). Cette variabilité écophysiological a été fréquemment observée sur des espèces de nématodes cosmopolites (Karssen et Moens, 2006).

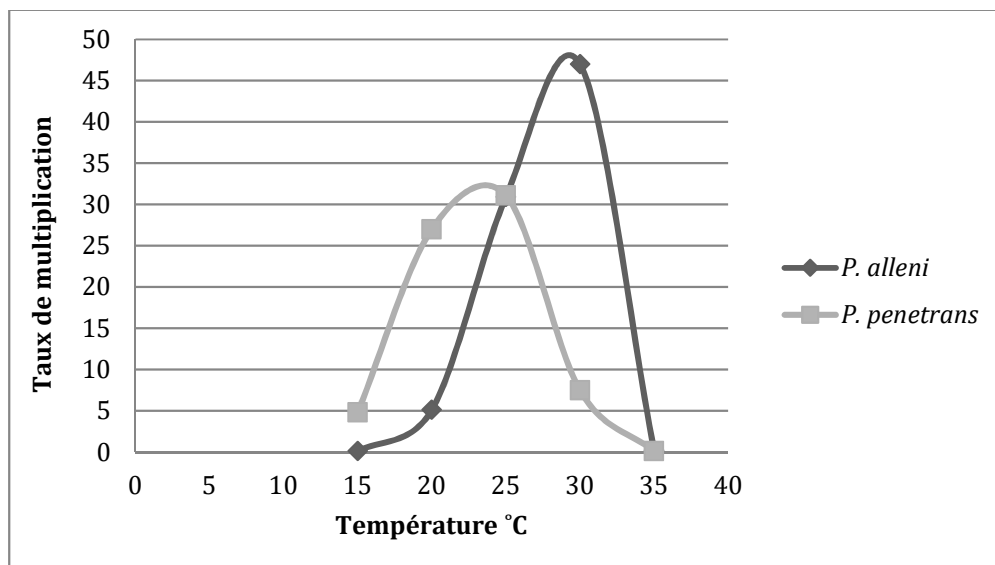


Figure 3: Taux de multiplication (population finale /population initiale) de *P. alleni* et *P. penetrans* sur des racines de soya dans un loam sableux après 75 jours de croissance pour différentes températures. Source : d'après les résultats d'Acosta et Malek (1979).

1.2.11 Impact économique de *Pratylenchus alleni* et *Pratylenchus penetrans*

Les symptômes sur les parties aériennes des plantes associées aux nématodes des lésions sont souvent confondus avec des carences nutritionnelles ou autres maladies. Étant un nématode très commun en Amérique du Nord, les dommages causés aux cultures par *P. penetrans* ont été largement étudiés (Dickerson *et al.*, 1964; Olthof et Potter, 1973; Zasada *et al.*, 2015). Les symptômes typiques de l'infestation de *P. penetrans* sur ses hôtes sont une réduction de la croissance racinaire et un jaunissement des parties aériennes qui sont similaires à une déficience en eau ou en azote. Dans les champs, ces symptômes sont généralement observés sur des zones circulaires de plusieurs mètres de diamètre (Dickerson *et al.*, 1964). Comme mentionné dans les paragraphes précédents, les symptômes observés sur les parties

souterraines des plantes sont davantage spécifiques et, par conséquent, moins à risques d'être confondus avec une carence ou autre maladie. Le symptôme typique est une coloration brunâtre localisée sur les racines. Dans les cas d'infestations sévères, les plants peuvent être facilement extirpés du sol en raison de la destruction des racines (Fosu-Nyarko et Jones, 2016).

Parmi les centaines d'espèces hôtes de *P. penetrans* figure le soya. Des facteurs de reproduction (population finale/population initiale) variant entre 1,6 et 9,2 ont été calculés sur le cultivar de soya Lee 68 par Schmitt et Barker (1981). Dans cette étude, des pertes de rendement significatives de 47% sur les plants de soya inoculés avec 2450 nématode/500g de sol ont été calculées comparativement aux plants témoins (non inoculés). De plus, en Ontario, les pertes de rendement causées par *P. penetrans* étaient de 30% pour le maïs sucré et 14% pour l'oignon avec une densité initiale à la plantation de 666 nématodes/ kg de sol. Les pertes étaient de 49% et 71% avec une densité initiale de 18 000 nématodes/ kg de sol. Des réductions variant entre 17 et 59% ont aussi été observées sur le chou, la laitue, le chou-fleur et la pomme de terre avec une densité initiale de 18 000 nématodes/ kg de sol (Olthof et Potter, 1973). Dans une autre étude réalisée en Ontario, les pertes de rendements de la betterave, de la laitue et de l'épinard étaient de 27, 43 et 21% respectivement avec une densité initiale de 18 000 *P. penetrans*/kg de sol (Potter et Olthof, 1974).

Au contraire, les dommages aux cultures causés par *P. alleni* ont rarement été étudiés. Ferris et Bernard (1962) ont noté que le poids des racines de soya en présence de *P. alleni* était réduit de 25 % lors d'essais en serres, par contre, aucun effet sur la croissance des parties

aériennes et le rendement n'a été observé. Ils suggèrent qu'en champs, où les nutriments et l'eau sont des facteurs limitants, une diminution de la croissance des parties aériennes et du rendement pourrait être mesurée. De fait, une autre étude a mesuré des pertes de rendement variant de 38 à 54 % dans des parcelles de soya infestées comparativement à des parcelles asymptomatiques voisines (Bélair *et al.*, 2013).

1.2.12 Moyens de lutte contre les espèces du genre *Pratylenchus*

Le succès de la lutte contre les ravageurs se fonde principalement sur la connaissance de leurs interactions avec les plantes et du cycle de vie du ravageur. Il existe de nombreuses méthodes de lutttes visant à protéger les cultures des ravageurs indésirables dont, la lutte chimique, les pratiques culturales, dont la rotation des cultures, la lutte biologique et la lutte génétique (Lewis *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 2002). Dans cette dernière, on retrouve, entre autres, l'utilisation de cultivars possédant une source de résistance. L'utilisation de cultivars résistants possède de nombreux avantages, par exemple, cette méthode n'est pas nocive pour l'environnement comme le sont la plupart des pesticides et est peu coûteuse. De plus, elle s'avère extrêmement efficace pour lutter contre certains nématodes phytoparasites sédentaires (nématodes qui complètent leur cycle de vie fixés sur les racines) comme le nématode à kyste du soya (NKS; *Heterodera glycines* Ichinohe) (Cook et Starr, 2006; Niblak *et al.*, 2008).

Les gènes de résistance aux nématodes se définissent comme étant des gènes de la plante codant un déterminant spécifique pour l'activation des réponses de défenses de la plante à un

agent pathogène afin de prévenir ou limiter la multiplication du nématode (Trudgill, 1991; Williamson et Kumar, 2006). Généralement, la résistance ne protège pas la plante contre une invasion, mais est plutôt caractérisée par l'incapacité des nématodes femelles à produire un site nourricier fonctionnel pour supporter leur reproduction (Williamson et Kumar, 2006). Le fait que les nématodes des lésions n'induisent pas la formation de cellules nourricières spécialisées comme les NKS rend difficile de trouver une source de résistance et d'élucider les mécanismes impliqués (Rios *et al.*, 2016). La résistance de l'hôte aux espèces de *Pratylenchus* est très limitée, seulement une très faible quantité de *loci* ont été liées à la résistance contre les *Pratylenchus*. Parmi ceux-ci, le gène de résistance *Rlnn1* de la variété de blé *Excalibur* a été validé pour lutter contre *P. neglectus* (Williams *et al.*, 2002).

Les gènes de résistances ont été largement étudiés chez les nématodes spécialistes comme le NKS, *Heterodera glycines*, découvert pour la première fois au Québec en 2013 au même endroit où *P. alleni* a été découvert (Williamson et Kumar, 2006; Mimee *et al.*, 2014). En effet, de nombreux gènes de résistances contre ce nématode endoparasite sédentaire ont été isolés sur différents cultivars de soya. En Amérique du Nord, la plupart des soyas commerciaux résistants aux nématodes à kystes du soya sont développés à partir de deux sources de résistance : Peking et PI88788 (De Bruin et Pedersen, 2008; Lee *et al.*, 2015). La réponse du groupe PI88788 se caractérise par une nécrose assez lente et par l'absence d'accroissement de la paroi cellulaire. À l'inverse, la réponse de la source de résistance Peking se caractérise par une nécrose rapide et un accroissement de la paroi cellulaire (Klink *et al.*, 2013). En raison de son efficacité, l'utilisation de gènes de résistance dans les cultures de grandes importances,

tel le soya, devrait être encore plus fréquente pour les années à venir afin de limiter les pertes de rendement et maximiser la production (Rosenzweig et Tubiello, 2007).

1.2.13 Détection et quantification moléculaire des *Pratylenchus* spp. par qPCR

La distinction entre *P. penetrans* et *P. alleni* basée sur la morphologie est difficile et requiert une grande expertise puisqu'il y a peu de structures ou caractères distinctifs et qu'il existe une variabilité intraspécifique de certains caractères morphologiques (Tarte et Mai, 1976). De nombreuses méthodes de diagnostic moléculaire ont été développées en nématologie et permettent de distinguer efficacement les espèces du genre *Pratylenchus* (Oliveira *et al.*, 2011). L'une de ces méthodes est la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui permet d'amplifier des régions d'ADN qui diffèrent entre des espèces phylogénétiquement proches (Al-Banna *et al.*, 2004; Carrasco-Ballester *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2008; Waeyenberge *et al.*, 2009). Par exemple, Waeyenberge *et al.* (2009), ont développé une méthode très sensible permettant d'identifier spécifiquement *P. penetrans* par PCR. Toutefois, cette méthode de détection ne permet pas la quantification de l'abondance des nématodes.

L'approche par PCR quantitative (qPCR ou PCR en temps réel) permet de quantifier l'abondance d'un organisme. Cette méthode est largement utilisée dans de nombreux domaines comme la médecine et l'agriculture afin de quantifier des agents viraux, fongiques ou bactériens (Poddar, 2003; Wang *et al.*, 2005). En agriculture, la qPCR est devenue indispensable pour de nombreuses expériences réalisées autant en laboratoire, en serre que sur le terrain. Par exemple, la qPCR a déjà été utilisée afin de déterminer les effets de différents traitements sur le potentiel reproductif de nématodes phytoparasites ou sur la

compétition entre espèces en quantifiant spécifiquement l'abondance relative des espèces de nématodes (Gao, 2006; Oliveira *et al.*, 2011).

Plusieurs méthodologies par qPCR ont été développées chez différentes espèces de nématode du genre *Pratylenchus* dont *P. neglectus* (Yan *et al.*, 2013), *P. thornei* (Yan *et al.*, 2012), *P. xiae* (Berry *et al.*, 2008) et *P. penetrans* (Sato *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2011; Goto *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2012; Mokrini *et al.*, 2013). Par contre, une telle application n'existe pas pour *P. alleni* ou pour la quantification simultanée de *P. penetrans* et *P. alleni*. Le développement d'une telle méthode serait d'une grande utilité pour une gestion efficace de ces deux espèces.

1.2.14 Principes théoriques de la qPCR

L'approche par qPCR est semblable à la PCR traditionnelle. La majeure différence étant que la méthode qPCR permet de suivre en continue la détection de l'ADN amplifié et ne nécessite pas de manipulation post-amplification comme pour la PCR (Ginzinger, 2002; Poitras et Houde, 2002). Le suivi de l'amplification de l'ADN est possible grâce à l'utilisation de fluorophores. Les données de fluorescences sont enregistrées à chaque cycle d'amplification et représentent la quantité de produits amplifiés à ce cycle. Si l'on suit la fluorescence au cours du temps lors d'une qPCR, une augmentation la fluorescence est observée et la courbe de fluorescence obtenue suit la forme typique de la figure 4. La courbe se divise en trois phases distinctes : le bruit de fond, la phase exponentielle et le plateau. Dans la première phase, l'amplification est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond. Dans la phase exponentielle, le signal de fluorescence est supérieur au seuil de détection et la quantité de produits amplifiés double à chaque cycle. À la phase plateau (ou de

saturation), certaines composantes nécessaires à l'amplification deviennent limitantes et l'amplification n'est pas exponentielle. Le Cq est le cycle de quantification auquel la fluorescence a dépassé le seuil de détection (Heid *et al.*, 1996).

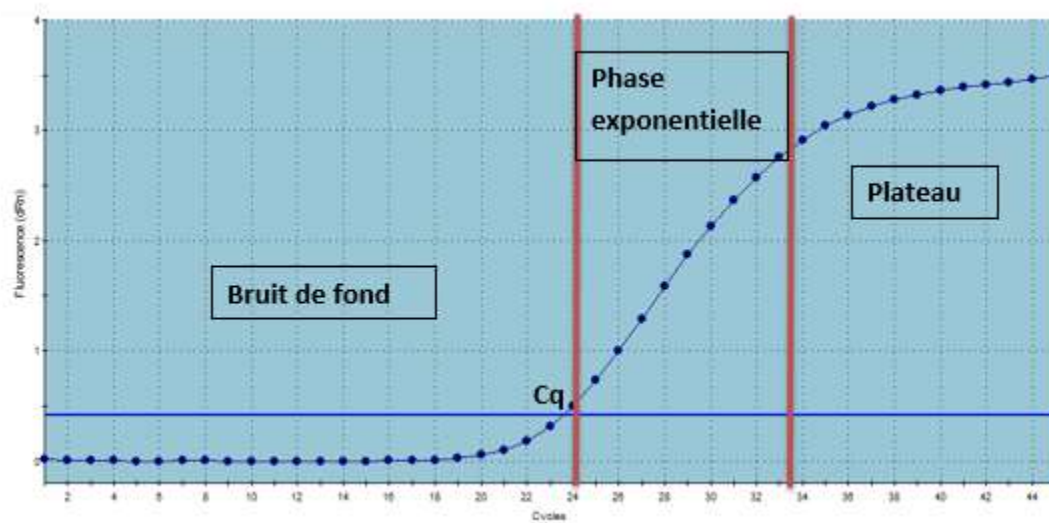


Figure 4: Courbe d'amplification qPCR typique d'une séquence ADN cible marquée par une sonde fluorescente (D'après Sigma qPCR Technical Guide, Sigma-Aldrich, 2008).

1.2.14.1 Technologies de détection

Il existe principalement deux technologies pour la détection et la quantification des amplicons : les agents se liant à l'ADN doubles brins et les sondes fluorescentes (Poitras et Houde, 2002). Le très connu fluorophore intercalaire SYBR Green fait partie de la première catégorie. À l'état libre, il n'exhibe que très peu de fluorescence. Or, à l'étape d'élongation de la PCR, il s'incorpore entre les deux brins de l'ADN et une augmentation de la fluorescence est observée. La technologie SYBR Green est moins coûteuse que l'autre technologie puisqu'elle

ne nécessite aucune expertise pour l'élaboration de la sonde fluorescente. Néanmoins, cette technologie ne permet pas de discriminer les différents amplicons présents, car SYBR Green n'est pas spécifique. Il se lie entre tous les doubles brins d'ADN (Poitras et Houde, 2002).

Une des technologies associées avec l'utilisation de sondes fluorescentes se nomme l'hydrolyse de sondes TaqMan (Poitras et Houde, 2002). Les sondes TaqMan sont de petits oligonucléotides linéaires contenant un fluorophore à leur extrémité 5' et un *quencher* à l'extrémité 3' qui désactive l'état excité du fluorophore, donc qui empêche l'émission de la fluorescence lorsque la sonde est intacte. L'hydrolyse de sondes se base sur l'activité 5'-exonucléase de l'enzyme d'amplification *Taq polymérase*. Plus précisément, la *Taq polymérase* dégrade les sondes fluorescentes qui ont été précédemment incorporées à la réaction et liées à la séquence qui sera amplifiée. C'est la dégradation des sondes fluorescentes hybridées à l'ADN qui permet la libération des fluorophores. Cette libération permet ainsi qu'un signal fluorescent soit émis. Le signal fluorescent est mesuré à chaque cycle d'amplification (Poitras et Houde, 2002). Chaque fluorophore émet une fluorescence unique (Figure 5). En raison du chevauchement des spectres de fluorescence, un nombre maximum de cibles peuvent être quantifiées dans une seule réaction (Tse et Capeau, 2003). Comme le marqueur fluorescent émet de la lumière proportionnellement à la concentration d'ADN amplifié, il est possible de quantifier le nombre de copies d'une séquence cible présente au départ.

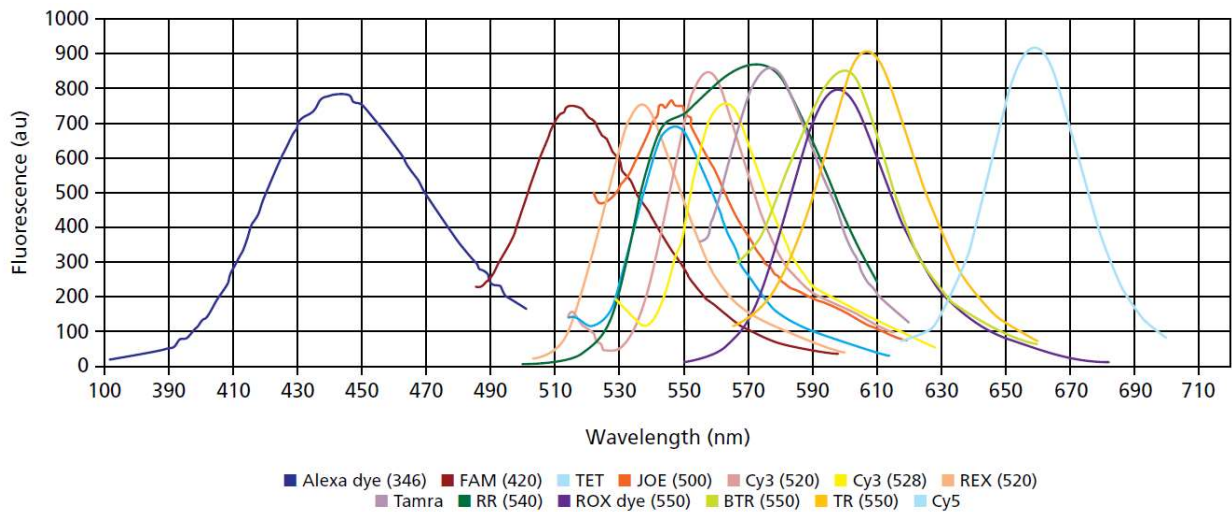


Figure 5: Courbes d'émission de fluorophores communs (Tirée de Sigma qPCR Technical Guide, Sigma-Aldrich, 2008).

1.2.14.2 Les stratégies de quantification : quantification absolue et relative

Avec les résultats du qPCR, il est possible de quantifier l'ADN de façon absolue ou relative. La quantification absolue permet de déterminer la quantité absolue du nombre d'amplicons dans un échantillon. Celle-ci nécessite l'utilisation d'une courbe standard. La courbe standard représente les valeurs de Cq obtenues d'une dilution en série d'un échantillon standard à concentration connue en fonction du logarithme de la concentration de la séquence cible. Le Cq obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue sera ainsi comparé à la droite (Tse et Capeau, 2003).

Quant à elle, la quantification relative ne nécessite pas de courbe standard. Elle permet plutôt d'analyser la quantité d'amplicons cibles relativement à un gène de référence. Par conséquent, cette méthode de quantification ne permet pas d'exprimer le résultat final par

une valeur absolue comme pour la méthode de quantification absolue. Le résultat final s'exprime par un indice (Tse et Capeau, 2003).

1.2.14.3 Structure de l'ADN ribosomique des nématodes

L'ADNr (ADN ribosomique) est fréquemment utilisée comme marqueur moléculaire afin de révéler la variabilité génétique qui permet d'identifier le polymorphisme entre les espèces de nématode (Al-banna *et al.*, 1997; Subbotin *et al.*, 2001). Chez les eucaryotes, l'ADNr est formé de répétitions en tandem et comprend l'ADNr 18S, l'ADNr 5,8S et l'ADNr 28S, entre lesquelles se trouvent les ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Figure 6) (Hillis et Dixon, 1991). Chez les nématodes, les séquences des gènes 18S, 28S et 5,8S sont plus conservées que les séquences des ITS. De plus, la séquence de la grande sous-unité ribosomique (LSU, 28S) est plus variable que celle de la petite sous-unité (SSU, 18S et 5,8S) ce qui permet, avec plus de succès, d'inférer les relations phylogénétiques entre deux organismes d'une même espèce. Pour plusieurs nématodes, ces séquences sont disponibles dans les bases de données d'ADN.

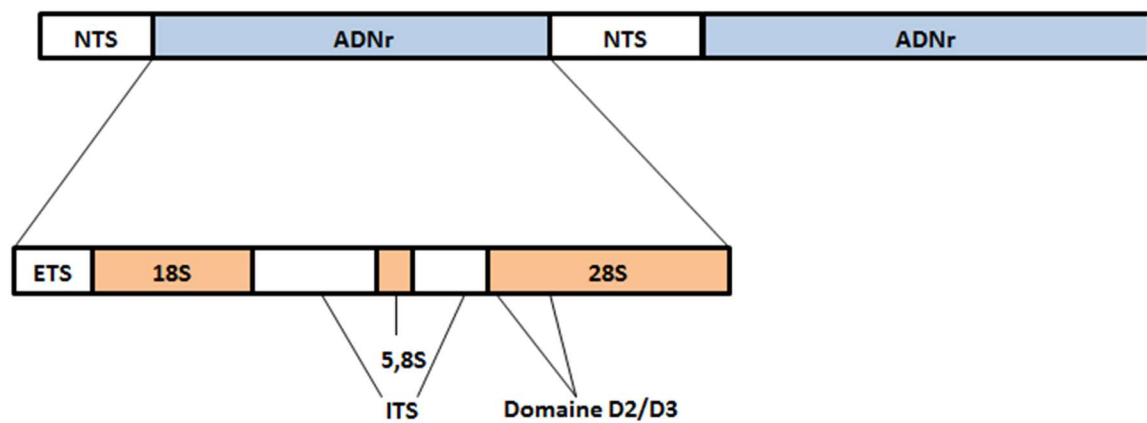


Figure 6: Structure générale de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes (D'après Hillis et Dixon, 1991).

1.3 Objectifs

Ce mémoire a pour objectif principal l'acquisition de connaissances sur le nématode des lésions *P. alleni* nouvellement découvert au Canada.

Mes objectifs se présentent ainsi :

- 1) Déterminer le spectre d'hôtes de *P. alleni* parmi huit cultures (le soya, le maïs, le seigle, le blé, la pomme de terre, la luzerne, le trèfle rouge et le millet) et dont la plupart sont considérées sensibles à *P. penetrans*.
- 2) Déterminer le pouvoir pathogène de *P. alleni* dans trois types de sol : sable, argile et loam.
- 3) Déterminer le taux de reproduction de *P. alleni* sur trois cultivars de soya commerciaux dont deux possédants une source de résistance aux NKS (PI88788 et Peking) et un sensible aux NKS dans les conditions climatiques actuelles et futures (horizons 2046-2065 et 2081-2100) et déterminer si les sources de résistances PI88788 et Peking ont une influence sur la reproduction de *P. alleni*.
- 4) Développer une méthodologie pour la quantification simultanée de *P. penetrans* et de *P. alleni* par PCR quantitative.

1.4 Hypothèses

- 1) À la lumière des études antérieures, le potentiel reproducteur de *P. alleni* varie selon la plante hôte.
- 2) Les espèces du genre *Pratylenchus*, dont *P. penetrans*, ont généralement un taux de reproduction plus élevé dans un substrat sableux. *P. alleni* aura ainsi un taux de reproduction élevé dans un substrat de ce type.
- 3) Les changements climatiques prévus pour les horizons 2046-2065 et 2081-2100 influenceront positivement la reproduction de *P. alleni* sur le soya. De plus, les soyas possédant une des sources de résistance, PI88788 ou Peking, n'auront pas ou peu d'effets sur la reproduction de *P. alleni*.
- 4) La méthode de quantification par PCR quantitative développée permettra de discriminer et de quantifier simultanément *P. alleni* et *P. penetrans* présents dans un même échantillon.

Chapitre 2 : *Pratylenchus alleni* : plantes hôtes potentielles et importance de la texture du sol sur sa reproduction

2.1 Résumé

La connaissance de la spécificité parasitaire d'un nématode phytoparasite et de l'influence des facteurs édaphiques sur les relations plantes-nématodes est nécessaire pour développer une gestion efficace des nématodes ravageurs. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer la convenance de 1) huit cultures communes du nord-est de l'Amérique du Nord (le soya, le maïs, le seigle, la pomme de terre, le trèfle rouge, le millet, le blé et la luzerne), et 2) trois types de sol (sable, argile, loam) sur la reproduction de *Pratylenchus alleni*, un nématode endoparasite migrateur des racines exotique au Canada. Les densités de population finale ont montré que *P. alleni* est polyphage puisque l'espèce parasite avec succès le soya, le maïs, la pomme de terre, le millet et le blé. Au contraire, le trèfle rouge et la luzerne ont été classés comme des plantes non-hôtes de *P. alleni*. Celles-ci pourraient être envisagées comme cultures de rotation en champs. De plus, la reproduction de *P. alleni* était favorisée dans un substrat argileux, sans être inhibée dans les substrats de sable et loam. Ces résultats suggèrent que *P. alleni* pourrait devenir problématique dans les régions agricoles de l'est du Canada où les cultures du maïs et du soya sont abondantes.

2.2 Introduction

Le nématode des lésions *Pratylenchus alleni* Ferris, un endoparasite migrateur des racines, a été répertorié dans sept pays répartis sur quatre continents et a été associé à de nombreuses plantes incluant des cultures fourragères et maraîchères (Singh et Jain, 1984; Van der Berg et Cadet, 1992, Doucet *et al.*, 2005; Bélair *et al.*, 2013). Considéré rare au Canada, *P. alleni* n'a été détecté qu'au sud de la province de Québec dans un champ de soya en rotation avec du maïs et du blé au cours de l'année 2011 (Bélair *et al.*, 2013). Dans ce champ, il a occasionné des pertes de rendement variant entre 38 et 54% comparativement aux parcelles asymptomatiques voisines. D'après une étude sur le statut de parasite de *P. alleni* sur un éventail de cultures, son taux de multiplication (population finale/population initiale) est élevé sur le haricot vert, la tomate, le blé, le soya, le maïs et la pomme de terre, alors qu'il est faible sur la luzerne, le coton et le chou (Wartman et Bernard, 1985). Au-delà de ces informations, *P. alleni* a été peu étudié. L'un des principaux moyens de gestion des nématodes des lésions est la rotation de cultures sensibles avec des plantes non-hôtes permettant ainsi la réduction des populations sous un seuil économique de dommages (Rodrigues *et al.*, 2014; Forge *et al.*, 2015).

Parmi les conditions abiotiques, les facteurs édaphiques ont des incidences sur la distribution et la reproduction des nématodes du sol. Par exemple, puisque les nématodes se déplacent à travers les espaces poreux du sol, la texture et la structure du sol influencent leur dispersion et leur pénétration à l'intérieur des racines (Townshend, 1972; Norton, 1989; Neher, 2010). De façon générale, les nématodes du sol préfèrent les substrats de types sableux

comparativement aux sols argileux, lesquels se caractérisent par des pores de faibles diamètres et une capacité de rétention en eau élevée (Wallace, 1966). Les sols lourds, plus enclins à être saturés en eau et mal oxygénés, auraient des effets préjudiciables sur les nématodes (Neher, 2010).

Le but de cette étude est, premièrement, de déterminer la convenance de huit cultures communes de l'agriculture du nord-est de l'Amérique du Nord comme plantes hôtes de *P. alleni* et, deuxièmement, de déterminer l'influence de trois types de sol sur sa reproduction en conditions contrôlées. Ces informations permettront d'anticiper le potentiel d'établissement de *P. alleni* dans de nouvelles régions agricoles et d'envisager des pistes de solution pour limiter son expansion et favoriser le contrôle de ses populations.

2.3 Matériel et méthodes

2.3.1 Culture *in vitro* de *P. alleni* sur racines excisées

Des graines de maïs de variété Extra Early Super Sweet (Stokes Seeds, Thorold, Ontario) ont été stérilisées en les immergeant dans de l'éthanol (80%) pour 30 minutes, puis dans de l'eau de javel (15%) pour 10 minutes et, finalement, en les rinçant avec de l'eau distillée stérile lors de trois rinçages consécutifs de 5 minutes chacun. Les graines stériles ont ensuite été déposées dans un milieu de germination de Nutrient Agar (Sigma-Aldrich, 23 g/L) coulé dans des boîtes de pétri sous conditions stériles (à raison de 6 graines/boîte). Les boîtes ont été

incubées dans un cabinet de croissance (Sanyo) maintenu à 25°C durant 5 jours en noirceur continue.

Après 5 jours, les racines ont été coupées à une distance de 1 cm à partir de l'apex et déposées sur des géloses composées de Gamborg-B5 (3,2 g/L, Sigma-Aldrich), de sucrose (20 g/L) et de Phytigel (6 g/L, Sigma-Aldrich). Dix géloses ont été scellées et incubées dans un cabinet de croissance (Sanyo) à 30°C pour deux semaines à l'obscurité. Après ce délai et toujours sous conditions stériles, trois morceaux de gélose de 1 cm² prélevés dans un élevage *in vitro* de *P. alleni* (originaire de Saint-Anicet, Québec, Canada) contenant tous les stades de développement ont été déposés à proximité des racines. Ces boîtes de pétri ont été de nouveau scellées et incubées aux mêmes conditions. Après un délai de 2 à 4 mois, le nombre de *P. alleni* contenu dans les géloses a été estimé visuellement avec une loupe binoculaire. Plus de 100 000 nématodes par gélose ont été estimés, ainsi, un total de 2 géloses par expérience a été jugées nécessaires puisque 180 000 et 120 000 *P. alleni* seront inoculés lors de chacune des répétitions du test sur la convenance d'hôtes et pour le test sur l'influence du type de sol respectivement.

2.3.2 Extraction de *P. alleni* des milieux de culture et inoculation des plantules

Pour chacun des tests, 2 géloses ont été coupées en morceaux de 1 cm² et placées sur un tamis de 75 µm imbriqué sur un tamis de 20 µm. Les morceaux des deux boîtes ont été rincés avec de l'eau du robinet et les nématodes ont ainsi été récupérés sur le tamis de 20 µm et transférés dans un bécher de 500 mL. Un millilitre de solution de nématodes a été pipetée et transférée dans une coupelle à loupe binoculaire afin d'estimer le nombre de *P. alleni* viable

par mL. Cette étape a été répétée cinq fois afin d'estimer la densité de *P. alleni* dans le bécher. Subséquemment, la quantité (en mL) pour obtenir 2000 nématodes/ kg de sol sec a été déterminée. Ce ratio a été choisi parce qu'il représente un ratio plus élevé que le seuil de dommage économique estimé pour *P. penetrans* de 1000 larves/ kg de sol sec (McKeown et Potter, 2001). Lors des deux expériences, les volumes de suspension aqueuse de nématodes contenant tous les stades de développement, tel que déterminé plus haut, ont été déposés dans deux trous de 1 cm de diamètre et de 4 cm de profondeur, disposés à 1 cm de part et d'autre de la tige de la plante, deux semaines après l'émergence des plantes de tous les pots. L'inoculation à cette période assure la présence de racines pour *P. alleni*.

2.3.3 Expérience 1 : Hôtes potentiels de *P. alleni*

L'expérience 1 a été réalisée sous conditions contrôlées en serre au Centre de recherche et développement de Saint-Jean-sur-Richelieu d'Agriculture et Agroalimentaire Canada. Un total de huit cultures (traitement) communes en Amérique du Nord, la plupart étant considérées comme hôtes sensibles au nématode des lésions le plus commun de l'Est canadien, *P. penetrans*, à l'exception du millet perlé, ont été choisies. Chaque traitement a été répliqué 10 fois et l'expérience entière répétée 2 fois dans le temps. (Tableau IV). Les 80 pots de 15 cm de diamètre ont été remplis avec 1 kg de substrat pasteurisé composé de sable et de terre noire (3 :1). Les pots ont été disposés selon un plan d'expérience complètement aléatoire dans la serre. Afin de standardiser la grosseur des plantules de pommes de terre, des germes de grosseurs équivalentes ont été prélevés en coupant les tubercules qui ont ensuite été séchés pour 24 heures. Les semences et germes ont été semés afin d'obtenir un seul plant de millet,

maïs, soya et pomme de terre par pot et trois plants de trèfle rouge, luzerne, seigle et blé par pot.

Tableau IV: Liste des plantes utilisées pour le test d'hôtes potentiels de *Pratylenchus alleni*.

Famille	Nom commun	Espèce	Cultivar	Source
Fabaceae	Luzerne cultivée	<i>Medicago sativa</i>	Algonquin	Fournisseur local
Fabaceae	Trèfle rouge	<i>Trifolium pratense</i>	N/D ¹	N/D
Fabaceae	Soya	<i>Glycine max</i>	P90Y90	Pioneer Hi-Bred Ltd.
Poaceae	Blé d'automne	<i>Triticum aestivum</i>	Brome	Fournisseur local
Poaceae	Maïs	<i>Zea mays</i>	Extra Early Super Sweet	Stoke Seeds Ltd.
Poaceae	Millet perlé	<i>Pennisetum glaucum</i>	CFPM101	AERC Inc.
Poaceae	Seigle d'automne	<i>Secale cereal</i>	Danko	Fournisseur local
Solanaceae	Pomme de terre	<i>Solanum tuberosum</i>	Chieftain	Fournisseur local

¹N/D : Non-disponible

Les conditions en serre ont été programmées et maintenues à 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité et à des températures minimales et maximales de 18/24°C. Les plants ont été arrosés quotidiennement selon leur besoin et fertilisés quotidiennement avec une dilution N-P-K 20-8-20 du lundi au jeudi et une dilution 14-0-14 le vendredi. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps. La première répétition s'est déroulée de novembre 2014 à janvier 2015 et de juin à août 2015 pour la seconde répétition. Les deux répétitions ont pris fin 90 jours après l'inoculation de *P. alleni* s'assurant ainsi qu'il complète au moins deux générations.

2.3.4 Expérience 2 : Effet de la texture du sol sur la reproduction de *P. alleni*

L'expérience 2 n'a pas été répétée dans le temps. Deux cultures ont été sélectionnées soit le maïs cv. Extra Early Super Sweet (Stokes Seeds Ltd., Thorold, Ontario) et le soya cv. P90Y90 (Pioneer Hi-Bred Ltd., Johnston, Iowa). Ces cultures sont cultivées en alternance dans le champ de St-Anicet où *P. alleni* a été découvert pour la première fois au Canada. Elles ont été semées dans trois types de sol (traitement) différent selon une analyse granulométrique, soit un sol argileux, un sol sableux et un loam provenant de Saint-Jean-sur-Richelieu, Québec (Tableau V). Chaque traitement a été répliqué dix fois pour chacune des deux cultures. Les 60 pots de 15 cm de diamètre ont été remplis avec l'un des trois substrats préalablement pasteurisés. Les pots remplis avec le loam et l'argile ont été standardisés avec 1350 g de sol sec et le sable avec 1450 g. Les pots ont été disposés selon un plan d'expérience complètement aléatoire dans la serre. Les graines ont été semées afin d'obtenir un plant de maïs ou de soya par pot.

Tableau V: Classification des trois types de sol sélectionnés selon une analyse granulométrique pour déterminer l'influence du type de sol sur la reproduction du nématode des lésions *Pratylenchus alleni*.

Type de sol	% sable (2-0,05 mm)	% limon (0,05-0,002 mm)	% argile (<0,002 mm)
Loam	42	34	24
Argile limoneuse	14	39	47
Sable	90	8	2

Les conditions en serre ont été programmées et maintenues à 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité et à des températures minimales et maximales de 19/26°C. Les plants ont été arrosés quotidiennement selon leur besoin et fertilisés quotidiennement comme

l'expérience 1. L'expérience a pris fin 90 jours après l'inoculation de *P. alleni* et s'est déroulée de juillet à octobre 2015.

2.3.5 Extraction des larves du sol et des racines

Afin d'échantillonner les populations de nématodes, les parties aériennes des plantes de chaque pot ont été coupées et les racines ont été séparées du sol. Pour les pots contenant 3 plants, les racines des 3 plants ont été regroupées en un seul échantillon. Les nématodes ont été extraits du sol et des racines respectivement par les méthodes de l'assiette de Baermann et de la chambre à brouillard (Figures 7 et 8) (Seinhorst, 1950; Townshend, 1963). Pour la chambre à brouillard, les racines humides ont été coupées en sections de 1 cm et environ 15g de ces racines a été choisi de façon aléatoire pour être utilisé en chambre à brouillard à 22°C; les racines étant maintenues humides avec une bruine toutes les cinq minutes pour deux semaines afin de lessiver les larves des racines. Les nématodes ont été recueillis dans un entonnoir et une bouteille placés sous les racines. Suite à l'extraction, les racines utilisées dans la chambre à brouillard et celles restantes ont été séchées 3 jours à 70°C et pesées. En ce qui concerne les nématodes présents dans le sol, deux extractions ont été réalisées en prélevant deux échantillons de 100 cm³ de sol. Ce sol a été placé entre deux couches de papier de type essuie-tout immergées dans environ 150 mL d'eau du robinet pour une semaine à température ambiante. Les deux échantillons de sol et le sol restant de chaque pot ont été séchés 3 jours à 70°C et pesés. Les nématodes en suspension extraits par les deux techniques ont ensuite été recueillis par sédimentation dans des éprouvettes et transférés dans une coupelle à binoculaire pour être dénombrés sous une loupe binoculaire. Une estimation du

nombre total de nématodes dans le sol et dans les racines a ensuite été calculée à l'aide des poids secs racinaires et de sol. Le nombre de nématodes (juvéniles et adultes) extraits du sol a été additionné au nombre de nématodes dans les racines afin de déterminer la densité de population finale (Pf) de chaque pot.

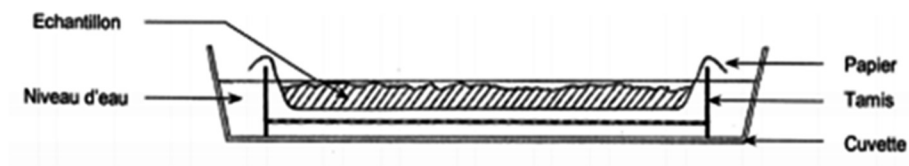


Figure 7: Schéma de la technique d'extraction de l'assiette de Baermann.



Figure 8 : Méthode d'extraction de la chambre à brouillard.

2.3.6 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels RStudio (RStudio Inc. version 0.99.893, Boston, É.-U.) et XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, É.-U.). Pour l'expérience

sur la convenance d'hôte, les données résultantes Pf (population finale) pour chaque culture ont été comparées entre les deux répétitions par des tests de t de Student afin de voir si l'effet bloc des répétitions dans le temps ont un effet sur les densités de populations finales d'une même culture. L'effet de la répétition dans le temps a été associé avec une hétérogénéité des données Pf entre les répétitions pour la pomme de terre, la luzerne et le trèfle rouge (Test t de Student, $n=10$, $P<0,05$). En raison de cette différence significative entre les deux répétitions dans le temps, les analyses statistiques ont été réalisées séparément comme deux expériences indépendantes.

Pour les deux expériences, les données d'abondance de nématodes et de poids secs racinaires ont été transformées au besoin selon $\ln(x+c)$ afin de satisfaire aux exigences de l'analyse de la variance (ANOVA). Le test de Shapiro-Wilk a permis de tester la normalité des données et le test de Bartlett a permis de tester l'homogénéité des variances. Pour l'expérience sur la convenance d'hôtes, le test de comparaisons multiples de Duncan ($P=0,05$) a été utilisé afin de déterminer les différences significatives entre les Pf de chaque plante hôte. Dans l'expérience sur l'influence du type de sol, le test de comparaisons multiples de Duncan ($P=0,05$) a été utilisé afin de déterminer les différences significatives entre les Pf des trois types de sol et entre les poids secs racinaires. Les figures et tableaux représentent les moyennes ($\bar{x} \pm$ erreur-types) des données non transformées.

2.4 Résultats

2.4.1 Expérience 1 :

Dans la répétition 1, les populations finales de *P. alleni* étaient significativement plus élevées sur la pomme de terre que sur les sept autres cultures (Figure 6). Aucune différence significative n'a été observée entre les populations finales de *P. alleni* sur le blé, le maïs et le soya, lesquelles étaient significativement plus élevées que celles retrouvées sur le millet, le seigle, la luzerne et le trèfle rouge (ANOVA ; $F=14,70$, $ddl=7$, $P<0,0001$). Dans la deuxième répétition, *P. alleni* se retrouvait significativement en plus grande quantité sur le maïs, la pomme de terre, le soya, le blé et le millet que sur le trèfle rouge et la luzerne (ANOVA ; $F=27,57$, $ddl=7$, $P<0,0001$).

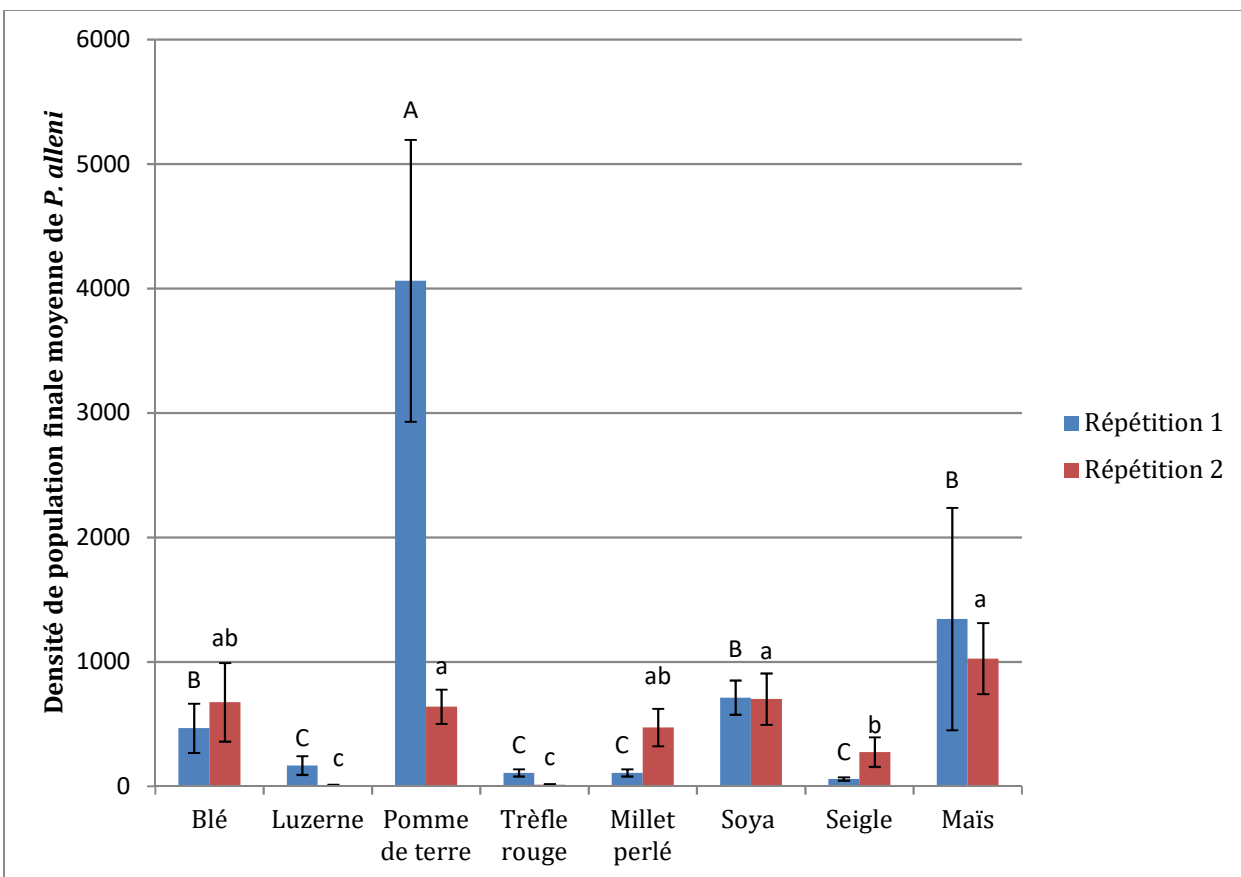


Figure 9: Densités de population finale (Pf) moyennes ($\bar{x} \pm \text{erreur-types}$) de *Pratylenchus alleni* sur huit cultures estimées 90 jours suivant l'inoculation de 2000 nématodes. Pour une même répétition, les données suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$) selon le test de comparaisons multiples de Duncan.

2.4.2 Expérience 2

Le type de sol affecte les densités de population finale de *P. alleni* sur le soya et le maïs (Tableaux VI et VII). Les populations de *P. alleni* dénombrées étaient significativement plus élevées dans l'argile que dans le sable autant sur le maïs que le soya (ANOVA; Maïs, $F=5,62$, $ddl=2$ $P<0,01$; Soya, $F=8,67$, $ddl=2$, $P<0,001$). Pour le soya, aucune différence de densité de population finale n'a été détectée entre l'argile et le loam. Pour le maïs, aucune différence significative n'a été observée entre le loam et le sable. Dans les trois types de sol, les poids

secs racinaires n'étaient pas significativement différents chez le maïs et le soya, respectivement ($P>0,05$).

Tableau VI: Densité de population finale de *Pratylenchus alleni* et poids secs racinaires mesurés sur le soya cv. P90Y90 dans trois types de sol 90 jours suivant l'inoculation.

Type de sol	Densité de population finale (Pf) ¹ ± ES ²	Poids secs racinaires (g) ± ES
Argile	1849,06± 269,09 a ³	3,17± 0,39 a
Loam	1301,20± 180,00 a	2,27± 0,23 a
Sable	648,46± 141,92 b	3,31± 0,47 a

¹Données non transformées ; moyenne de 10 réplicats. ²ES = erreur-type. ³Les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P> 0,05$) selon le test de comparaisons multiples de Duncan.

Tableau VII: Densité de population finale de *Pratylenchus alleni* et poids secs racinaires mesurés sur le maïs cv. Extra Early Super Sweet dans trois types de sol 90 jours suivant l'inoculation.

Type de sol	Densité de population finale (Pf) ¹ ± ES ²	Poids secs racinaires (g) ± ES
Argile	5249,44± 1941,78 a ³	15,61± 2,42 a
Loam	1303,61± 396,95 b	15,06± 3,53 a
Sable	1154,01± 206,75 b	23,47± 5,60 a

¹Données non transformées ; moyenne de 10 réplicats. ²ES = erreur-type. ³Les données suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P> 0,05$) selon le test de comparaisons multiples de Duncan.

2.5 Discussion

La présente étude génère de l'information concernant les convenances d'hôte de *P. alleni* et l'influence du type de sol sur sa reproduction. Pour l'étude sur la convenance d'hôtes, les résultats des deux répétitions dans le temps ont été rapportés séparément en raison des différences entre les résultats obtenus. Ces différences de sensibilité des plantes aux

nématodes sont probablement reliées aux variations saisonnières dans les conditions de croissance principalement la température et la luminosité. Malgré ces différences, l'habileté de *P. alleni* à parasiter le soya, le millet perlé, le maïs, la pomme de terre et le blé démontre la polyphagie de ce nématode. Sa pathogénicité sur le soya avait déjà été établie (Ferris et Bernard, 1962; Acosta et Malek, 1979). Dans l'ensemble, nos résultats confirment les observations de Wartman et Bernard (1985) qui ont rapporté une reproduction plus élevée de *P. alleni* sur la pomme de terre, le soya et le maïs que sur la luzerne. Résultat étonnant, nous avons observé une reproduction de *P. alleni* sur le millet perlé. Cette culture a été introduite en rotation dans les régions agricoles du Québec pour réduire les densités de population de *P. penetrans*, espèce la plus observée dans les parcelles de grandes cultures au Québec (Dauphinais *et al.*, 2005). L'identification d'une culture alternative ciblant la réduction simultanée des populations de *P. penetrans* et *P. alleni* est donc de mise. Nos résultats ont permis d'identifier quelles sont les cultures de rotation les plus problématiques en termes de reproduction de *P. alleni* et d'identifier des cultures non-hôtes. Étant donné la faible capacité de reproduction de *P. alleni* sur la luzerne et le trèfle rouge, ceux-ci pourraient être proposés comme culture de rotation afin de réduire les populations de *P. alleni* dans les champs infestés. Des tests de rotation devront cependant être réalisés en alternant des hôtes sensibles et des plantes non-hôtes afin de valider nos résultats en grandes parcelles et d'établir des plans de rotation efficaces à suggérer aux producteurs. De plus, des tests avec des cultivars différents de ceux utilisés devront être réalisés puisque l'effet sur la reproduction du nématode peut être considérablement différent selon le cultivar (Machado et Filho, 2016; Rios *et al.*, 2016).

À l'exception de la pomme de terre de la répétition 1, toutes les densités de population finale estimées sont inférieures aux densités d'inoculation. Bien que ce résultat puisse paraître surprenant, il n'était pas inattendu. En effet, ce résultat s'explique en grande partie par le faible pourcentage d'efficacité de la méthode de récupération des nématodes dans le sol, l'assiette de Baermann, méthode standard d'extraction des nématodes, sous-estime les densités de population finale (Whitehead et Hemming, 1965; McSorley et Walter, 1991) puisqu'elle ne permettrait la récupération que de 30% des nématodes présents dans l'échantillon de sol (McSorley et Walter, 1991). De plus, les faibles Pf peuvent être la conséquence d'une surestimation du nombre de nématodes qui ont été inoculés. Inclure tous les stades de vie dans un inoculum tend à surestimer les nématodes qui peuvent parasiter les racines et donc contribuer à la production d'une seconde génération. À la lumière de cette étude, nos estimations des Pf des deux expériences sont possiblement largement sous-estimées, mais n'interfère, en aucun cas, avec les comparaisons entre les traitements.

Pratylenchus alleni complète son cycle de vie entre 20 et 60 jours selon la température et après 90 jours, il aurait atteint une deuxième génération au minimum sous les régimes climatiques utilisés. Dans la serre, la température journalière moyenne était de 21°C, soit sous la température optimale de reproduction de 30°C de *P. alleni* (Acosta et Malek, 1979). Malgré une température sous-optimale, *P. alleni* devrait avoir un taux de multiplication beaucoup plus élevé sous les régimes climatiques utilisés. Selon Acosta et Malek (1979), *P. alleni* possède un facteur de reproduction moyen de 5,1 à température constante de 20°C sur le soya croissant dans un loam sableux durant 75 jours. Ces résultats indiquent que les régimes de

températures utilisés ne devraient pas avoir un effet négatif prépondérant sur sa reproduction. La méthode d'extraction des nématodes du sol a possiblement eu une influence plus importante sur les données Pf que les températures utilisées en serre.

L'influence du type de sol sur le développement de *P. alleni* a été évaluée avec le maïs et le soya. Ces deux cultures représentent la plus grande superficie récoltée au Québec en 2015 (approximativement 738 000 hectares), et étaient aussi les deux cultures en rotation dans le champ où *P. alleni* a été découvert au Québec (Bélair *et al.*, 2011; Institut de la statistique du Québec, 2015). Pour le maïs, la densité de population finale de *P. alleni* s'est avérée 5,4 fois plus élevée dans un sol de type argileux que dans le sable, alors que pour le soya, la densité de population finale s'est avérée 2,8 fois plus élevée dans l'argile que dans le sable. En général, les nématodes phytophages, incluant les espèces du genre *Pratylenchus*, sont davantage retrouvés dans des sols sableux (Norton *et al.*, 1971; Zivakparvar *et al.*, 1980; Choshali *et al.*, 2015) qui sont les plus adaptés aux mouvements de *P. penetrans* (Townshend et Weber, 1971). Peu d'études ont rapporté des taux de reproduction de *Pratylenchus* plus élevés dans un substrat d'argile ; les seules exceptions concernent *P. thornei*, *P. neglectus* et *P. helophilus* (Seinhorst, 1959; Grandison et Wallace, 1975; Thompson *et al.*, 2010).

Les sols du sud-ouest du Québec sont généralement caractérisés par une texture de loam à loam sableux ou d'argile (Carte pédologique, feuillet 31G01101, IRDA). Malgré des densités de population finale plus élevées dans l'argile, les résultats démontrent que *P. alleni* peut tout de même se reproduire dans trois types de sol utilisés (sable, loam et argile). Ainsi, les sols du sud-ouest du Québec pourraient favoriser la reproduction de *P. alleni* et son établissement

vers d'autres régions agricoles. Les échantillonnages en cours dans toutes les régions du Québec afin d'établir une première carte de distribution de *P. alleni* permettront d'établir si nos résultats de préférence de types de sol sont transférables au champ.

En ce qui concerne les poids secs racinaires du maïs et du soya, aucune différence n'a été observée entre les trois types de sol. Les faibles densités de population ne permettaient probablement pas d'infliger des dommages significatifs sur les racines des plantes hôtes.

2.6 Conclusion

Nos résultats ont confirmé le statut polyphage de *P. alleni*, lequel pourrait devenir problématique dans les systèmes agricoles dans l'est du Canada caractérisés par une alternance maïs et soya. La rotation des cultures avec des plantes non-hôtes comme la luzerne et le trèfle rouge pourrait être une solution à envisager pour limiter le développement des populations sous le seuil de dommages. Finalement, nos résultats ont montré que les sols de type argileux, sableux et le loam présents au Québec permettront la reproduction de *P. alleni*, mais celle-ci devrait être favorisée dans un sol argileux.

Chapitre 3 : Reproduction de *Pratylenchus alleni* sur trois cultivars de soya dans un contexte de changements climatiques

3.1 Résumé

Le nématode *Pratylenchus alleni* a été découvert pour la première fois au Canada en 2011 au même endroit où le nématode à kyste du soya (NKS), *Heterodera glycines*, a été découvert en 2013. Ce dernier, important ravageur des cultures de soya, amène les producteurs à choisir des cultivars de soya possédant une source de résistance à *H. glycines*. À ce jour, aucune source de résistance n'a été découverte pour *P. alleni*, mais il y a lieu de se demander si l'utilisation des cultivars résistants aux NKS aura un impact sur la gestion de *P. alleni*. Dans cette étude, *P. alleni* a été inoculé sur trois cultivars de soya dont deux issus de parents résistants aux NKS (S14-M4 et P19T01R) et un sensible aux NKS (P90Y90) soumis pour 90 jours à trois conditions climatiques différentes simulant les conditions actuelles et les conditions des horizons 2046-2065 et 2081-2100 prédites par le Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC). Les résultats ont montré que la taille finale des populations de *P. alleni* (individus/g de racines sèches) était plus élevée lorsque soumis aux températures du futur que dans les conditions climatiques actuelles. Par exemple, la reproduction de *P. alleni* était 2,6 fois plus élevée dans les conditions du futur (T3) que dans les conditions actuelles (T1). De plus, les cultivars résistants engendraient une certaine réduction de la reproduction de *P. alleni* comparativement au cultivar sensible dans les conditions du futur. En effet, dans les conditions du futur, la reproduction de *P. alleni* sur P90Y90 était 1,81 fois plus élevée que sur S14-M4 et 1,47 fois plus élevée que sur P19T01R. En conclusion, les conditions climatiques

attendues d'ici 2100 permettront à *P. alleni* de se reproduire davantage et pourraient favoriser son établissement vers d'autres régions productrices de soya, mais les cultivars résistants aux NKS pourraient aider à sa gestion.

3.2 Introduction

La production de soya au Canada augmente de plusieurs milliers d'hectares chaque année (Statistique Canada, 2015). Les CC devraient favoriser encore plus cette expansion aux latitudes plus élevées (Bootsma *et al.*, 2005). Malheureusement, plusieurs parasites causent d'importantes pertes de rendement à cette culture et pourraient profiter des CC pour s'établir sur celle-ci. Les espèces exotiques comme le nématode *Pratylenchus alleni* seront particulièrement à surveiller puisque le réchauffement climatique sera propice à son établissement.

La lutte génétique par l'utilisation de cultivars possédant des gènes de résistance est une solution efficace pour réduire certaines populations de nématodes phytoparasites (Matsuo *et al.*, 2012). Toutefois, très peu de gènes de résistance ont été identifiés et validés à ce jour pour les espèces du genre *Pratylenchus*. Or, pour le nématode à kyste du soya (NKS), *Heterodera glycines*, une espèce sympatrique, une sélection de cultivars résistants est disponible (Klink *et al.*, 2009; Matsuo *et al.*, 2012). Ce nématode, important ravageur des cultures de soya des États-Unis et de l'Ontario au Canada, a été détecté pour la première fois dans la province de Québec en 2013 au même endroit que *P. alleni* (Mimee *et al.*, 2014). Cette problématique amène ainsi les producteurs canadiens à choisir de plus en plus des cultivars de

soya avec des gènes de résistance aux NKS. C'est pourquoi il y a lieu de se demander si l'utilisation de ces cultivars aura un impact sur la gestion de *P. alleni*.

Étant donné que les températures de surface prévues d'ici 2100 seront de quelques degrés supérieures aux températures actuelles et se rapprocheront de la température optimale de reproduction de *P. alleni* (30°C; Acosta et Malek, 1979), le but de cette étude est de déterminer le potentiel de *P. alleni* à se reproduire sur trois cultivars de soya, dont deux issus de parents résistants aux NKS (PI88788 et Peking), et un considéré sensible aux NKS. Tout cela dans un contexte de changements climatiques, afin d'anticiper le comportement futur de *P. alleni* et d'assurer la pérennité de cette culture.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Plan d'expérience, cultivars et régimes climatiques

L'expérience a été réalisée sous conditions contrôlées en cabinets de croissance au Centre de recherche et développement de Saint-Jean-sur-Richelieu d'Agriculture et d'Agroalimentaire Canada. Trois cultivars de soya commerciaux ont été sélectionnés selon leur source de résistance aux NKS, dont deux cultivars issus de parents résistants aux NKS (S14-M4 et P19T01R) et un sensible aux NKS (P90Y90; Tableau VIII). Un total de 72 graines de chaque cultivar a été utilisée (36 témoins et 36 inoculés avec *P. alleni*). La germination des semences a été réalisée dans des papiers de type essuie-tout humides dans un cabinet de croissance maintenue à 28°C pour 3 jours. Le tiers des germes de chacun des cultivars a été réparti dans

trois cabinets de croissance soumis à trois régimes de températures et concentration en CO₂ différents représentant les conditions climatiques actuelles moyennes pour la région du sud du Québec (T1), les conditions attendues pour l'horizon 2046-2065 (T2) et pour l'horizon 2081-2100 (T3) (Tableau IX; GIEC, 2014). Chaque germe a été planté dans un tube Ray Leach Cone-tainer^{MC} (Stuewe & Sons, Inc., Oregon, modèle SC10L : 3,8 cm de diamètre par 21 cm de profondeur) contenant 200 g de mélange de sable sec (1 sable de plage : 1 sable de maçonnerie). Les tubes remplis de sable ont été placés verticalement dans des chaudières (30 cm de diamètre par 28 cm de haut) contenant un fond de deux cm d'épaisseur de Turface MVP (Turface Athletics, Illinois) (pour un total de 36 tubes/chaudière). Ainsi, six chaudières ont été nécessaires (2 chaudières/cabinet de croissance). Du mélange de sable a ensuite été placé dans l'espacement entre les tubes verticaux. La répartition des traitements (cultivars) à l'intérieur de chaque chaudière suivait un plan entièrement aléatoire. De plus, le choix des plants témoins et des plants inoculés était entièrement aléatoire dans chacun des cabinets de croissance. La photopériode des chambres de croissance a été maintenue à 16 heures de lumière pour 8 heures d'obscurité. Les plants ont été arrosés quotidiennement selon leur besoin en eau et fertilisés quotidiennement avec une dilution N-P-K 20-8-20 du lundi au jeudi et une dilution 14-0-14 le vendredi. L'expérience a été répétée deux fois dans le temps.

Tableau VIII: Caractéristiques des cultivars de soya sélectionnés.

Cultivar	Compagnie	Maturité relative ¹	Gènes de résistance aux NKS ²	Résistance aux herbicides ³	Couleur du hile ⁴
P19T01R	Pioneer Hi-Bred Ltd. (Mississauga, Ontario)	1,9	PI88788	RR	BR
S14-M4	Syngenta Canada, Inc. (Guelph, Ontario)	1,4	Peking	RR2Y	BL
P90Y90	Pioneer Hi-Bred Ltd. (Mississauga, Ontario)	0,9		RR	BR

¹Temps qu'un plant prend pour arriver à la maturité, le chiffre avant la virgule indique le groupe de maturité et le chiffre après la virgule classifie la maturité à l'intérieur du groupe. ²NKS=nématode à kystes du soya. ³RR=Roundup Ready^{MD}, RR2Y= Roundup Ready 2 yield ^{MD}.

⁴BR=brun, BL=noir.

Tableau IX: Régimes climatiques des trois cabinets de croissance.

T1 : conditions actuelles moyennes		T2 : conditions de l'horizon 2046-2065 ²		T3 : conditions de l'horizon 2081-2100	
Températures (°C)	Concentration CO ₂ (ppm ³)	Températures (°C)	Concentration CO ₂ (ppm)	Températures (°C)	Concentration CO ₂ (ppm)
12/23 ¹	400	15/26	800	17/28	1200

¹ 12/23°C = minimum atteint pour la période d'obscurité /maximum atteint pour la période de lumière. ² D'après GIEC (2014). ³Partie par million.

3.3.2 Extraction de *P. alleni* des milieux de culture et inoculation des plantules

Les besoins en *P. alleni* ont été estimés à 21 600 nématodes par répétitions dans le temps. Les *P. alleni* ont été extraits des élevages *in vitro* comme décrits au chapitre 2.3.1. Ils ont été transférés dans un bécher 300 mL et le volume final a été ajusté à 200 mL avec de l'eau du robinet. Un millilitre de la solution de nématode a été prélevé et déposé dans une coupelle à binoculaire afin de dénombrer le nombre de *P. alleni*. Cette étape a été répétée cinq fois afin d'estimer la densité de nématodes dans le bécher. Subséquemment, la quantité à prélever pour obtenir 200 *P. alleni* a été déterminée. Puisque le seuil de dommage économique de *P. alleni* n'a pas été déterminé, la quantité de 200 *P. alleni*/200g de sol sec représente le seuil de dommage économique de *P. penetrans* de 1 nématode/g de sol sec (McKeown et Potter,

2001). Les volumes d'inoculation nécessaires pour les répétitions 1 et 2 étaient donc de 0,37 et 0,73 mL. Ces volumes de la suspension aqueuse de nématodes ont été déposés à côté de la moitié des plantules de chacun des trois cultivars pour les trois chambres de croissance au moment de la transplantation des plantules.

3.3.3 Extraction de *P. alleni* du sol et des racines

L'expérience s'est terminée 90 jours suivant l'inoculation des nématodes. Les parties aériennes des plants ont été coupées et les racines ont été séparées du sol. Les nématodes ont été extraits du sol et des racines par les méthodes de l'assiette de Baermann et de la chambre à brouillard tel que décrites au chapitre 2.3.5 à l'exception que la totalité du sol et des racines de chaque tube a été utilisée. Suite à l'extraction, les racines ont été séchées durant 3 jours à 70°C et pesées. Les nématodes ont été dénombrés sous une loupe binoculaire afin d'évaluer les populations finales (Pf) et les Pf/g de racines sèches ont été calculées. Les données des deux répétitions dans le temps ont été regroupées pour les analyses statistiques.

3.3.4 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, É.-U). Les données Pf/g de racines sèches ont été transformées selon $\ln(x+c)$ afin de satisfaire aux exigences du test de l'analyse de la variance à deux facteurs (ANOVA). Le test de Shapiro-Wilk a permis de tester la normalité des données et le test de Bartlett a permis de tester l'homogénéité des variances. Le test de comparaisons multiples de Duncan ($P=0,05$) a été utilisé afin de déterminer les effets du régime climatique, du cultivar et de l'interaction entre les deux sur *P. alleni*. Pour les données Pf/g de racines sèches, une ANOVA à trois

facteurs suivie du test de comparaisons multiples de Duncan ($P=0,05$) a été utilisé pour déterminer l'effet du régime climatique, du cultivar, du traitement (inoculé ou témoin) et de l'interaction entre chacun sur les poids secs racinaires. Les Pf/g de racines sèches moyennes ont été présentées avec l'erreur-type calculée sur la moyenne et les valeurs de poids secs racinaires ont été présentées avec l'écart-type. Tous les tableaux présentent les données non transformées.

3.4 Résultats

3.4.1 Densités de population finale/g de racines sèches

3.4.1.1 Effet du régime climatique

Les résultats de l'ANOVA et du test de comparaisons multiples de Duncan sur l'effet individuel des régimes climatiques sur les populations finales de *P. alleni* sans égard pour les cultivars ont montré que la Pf/g de racines sèches était significativement plus faible dans les régimes T1 que dans T2 et T3, mais n'était pas significativement différente entre T2 et T3 (Tableau X).

3.4.1.2 Effet du cultivar

En ce qui concerne l'effet individuel du cultivar sur la Pf/g de racines sèches, celle-ci était significativement favorisée sur P90Y90 comparativement à S14-M4 et P19T01R. Aucune différence significative n'était observée entre ces deux derniers cultivars.

3.4.1.3 Effets de l'interaction entre les régimes climatiques et les cultivars

D'après les résultats de l'ANOVA à deux facteurs, une interaction significative entre le régime climatique et le cultivar a été observée. Ainsi, ces deux facteurs affectaient la taille finale des populations de *P. allenii* de façon dépendante. En d'autres termes, les régimes climatiques avaient un effet significatif sur les cultivars qui se reflétait sur la taille finale des populations.

Tableau X: Densités de population finale/g de racines sèches pour chacun des trois cultivars dans chaque régime climatique.

Densités de population finale/g de racines sèches ($\bar{x} \pm ES^1$)		
Régimes climatiques	T1	235,30 \pm 74,42 b
	T2	588,67 \pm 70,48 a
	T3	621,79 \pm 73,83 a
Cultivars	P90Y90	646,78 \pm 73,15 A
	S14-M4	357,05 \pm 78,03 B
	P19T01R	440,85 \pm 72,60 B
Régimes climatiques X cultivars	T1-P90Y90	195,67 \pm 122,22 z
	T1-S14-M4	126,21 \pm 136,09 z
	T1-P19T01R	352,11 \pm 117,00 yz
	T2-P90Y90	958,90 \pm 117,00 w
	T2-S14-M4	458,51 \pm 122,44 xyz
	T2-P19T01R	347,75 \pm 114,54 yz
	T3-P90Y90	751,09 \pm 119,63 wx
	T3-S14-M4	433,40 \pm 128,73 xyz
	T3-P19T01R	654,61 \pm 125,47 wxy
Résultats ANOVA	Régimes climatiques (RC)	$F=8,428$ $P<0,0001$
	Cultivars (C)	$F=3,974$ $P=0,02$
	RC X C	$F=2,839$ $P=0,026$

¹ES=erreur-type; ²les données suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de comparaisons multiples de Duncan ($P>0,05$).

3.4.2 Poids secs racinaires

3.4.2.1 Effet du régime climatique sur le développement des racines

Les résultats ont montré que les régimes climatiques ont un effet significatif sur les poids racinaires des trois cultivars en favorisant davantage le développement des racines dans les conditions T2 et T3 comparativement à T1 autant pour les plants témoins que les plants inoculés (Tableau XI).

3.4.2.2 Effet de la présence de *P. alleni* sur le développement des racines

Les résultats ont aussi montré que la présence de *P. alleni* affectaient négativement le développement des racines de soya. En effet, les poids secs racinaires étaient plus faibles chez les plants de soya infestés par *P. alleni* comparativement aux plants témoins.

3.4.2.3 Interactions

D'après les résultats de l'ANOVA à trois facteurs, des interactions significatives ont été observées entre les régimes climatiques et les cultivars (RC X C), les régimes climatiques et le traitement (inoculé ou témoin ; RC X T) et les cultivars et le traitement (C X T).

3.4.2.4 Pourcentage de diminution des poids secs racinaires

Les pourcentages de diminution des poids secs racinaires ont été calculés pour les trois cultivars dans les trois régimes climatiques. Ceux-ci variaient entre 18,92 et 58,33%. On note que même si les régimes climatiques ont un effet sur les poids racinaires, le pourcentage de diminution des poids secs racinaires est semblable dans les trois régimes climatiques. Ainsi,

l'impact de *P. alleni* sur le pourcentage de diminution des poids secs racinaires est similaire dans les trois régimes climatiques malgré les différences de températures et de CO₂ atm.

Tableau XI: Poids secs racinaires des plants témoins et des plants inoculés avec *P. alleni* et le pourcentage de diminution des poids secs racinaires pour chacun des trois cultivars de soya dans chacun des trois régimes climatiques.

Cultivars	Régimes climatiques	Moyenne des poids secs racinaires des plants témoins (g) ($\bar{x} \pm \text{ÉT}^1$)	Moyenne des poids secs racinaires des plants inoculés (g) ($\bar{x} \pm \text{ÉT}$)	Pourcentage de diminution des poids secs racinaires (%)
P90Y90	T1	0,39 \pm 0,29bc	0,23 \pm 0,13c ²	41,03
	T2	0,42 \pm 0,25b	0,31 \pm 0,21bc	26,19
	T3	0,75 \pm 0,33a	0,35 \pm 0,15bc	53,33
S14-M4	T1	0,37 \pm 0,18bc	0,30 \pm 0,11bc	18,92
	T2	0,73 \pm 0,39a	0,43 \pm 0,22b	41,10
	T3	0,65 \pm 0,39a	0,45 \pm 0,20b	30,77
P19T01R	T1	0,38 \pm 0,17bc	0,20 \pm 0,10c	47,37
	T2	0,84 \pm 0,58a	0,35 \pm 0,13bc	58,33
	T3	0,80 \pm 0,28a	0,47 \pm 0,30b	41,25
Résultats ANOVA	Régimes climatiques (RC)		$F=31,604$ $P<0,0001$	
	Cultivars (C)		$F=6,857$ $P=0,001$	
	Traitements (T)		$F=84,612$ $P<0,0001$	
	RC X C		$F=2,615$ $P=0,035$	
	RC X T		$F=4,794$ $P=0,009$	
	C X T		$F=3,283$ $P=0,039$	
	RC X C X T		$F=1,904$ $P=0,109$	

¹ÉT=Écart-type; ² Les données suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de comparaisons multiples de Duncan ($P>0,05$).

3.5 Discussion

De nombreuses études prédisent qu'une augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique et les CC subséquents, incluant l'augmentation des températures, altéreront la

pression par les phytoparasites ravageurs. Entre autres, les CC ont le potentiel d'apporter des changements démographiques et d'élargir les répartitions latitudinales des parasites ravageurs dont les nématodes (Somasekhar et Prasad, 2012; Chakraborty, 2013; Ziska et McConnell, 2015). Chez les nématodes phytoparasites, une augmentation des températures se traduit par une accélération du développement permettant ainsi un plus grand nombre de générations par saison. Dans la présente étude, *P. alleni* a été inoculé sur trois cultivars de soya commerciaux soumis à trois régimes climatiques différents représentant les conditions actuelles du sud du Québec (T1) et les conditions attendues pour l'horizon 2046-2065 (T2) et l'horizon 2081-2100 (T3). Les résultats ont démontré que *P. alleni* est affecté par les conditions climatiques utilisées. *Pratylenchus alleni* a une densité de population finale par g de racines sèches plus élevée lorsque soumis aux conditions climatiques prévues pour la période 2081-2100 (T3) et la période 2046-2065 (T2) que sous le régime climatique actuel (T1). De fait, la reproduction de *P. alleni* était 2,6 fois plus élevée dans T3 que dans T1 et 2,5 fois plus élevée dans T2 que dans T1. Ces résultats confirment que les conditions climatiques attendues à partir de 2046 influenceront positivement la reproduction de *P. alleni* et pourraient favoriser son établissement vers de nouvelles régions agricoles.

En utilisant trois cultivars commerciaux, dont deux possédants des sources de résistance pour lutter contre les NKS (PI88788 et Peking), nous avons pu déterminer si l'utilisation de ces cultivars aura un impact sur la gestion de *P. alleni*. D'après les résultats, des taux de reproduction plus faibles ont été associés avec les cultivars S14-M4 (Peking) et P19T01R (PI88788) comparativement au cultivar sensible aux NKS, P90Y90 dans les conditions T2 et T3.

Dans les conditions T2 et T3, la reproduction de *P. alleni* sur P90Y90 était près de deux fois plus élevée que sur les deux autres cultivars possédant une source de résistance. Ces deux sources de résistance aux NKS sont les deux sources les plus communément utilisées aux États-Unis. La source de résistance PI88788 est la source utilisée dans 95% du soya cultivé aux États-Unis. Cette source est connue pour fournir une résistance lente aux NKS (Klink *et al.*, 2009). L'autre source majeure est Peking. Celle-ci génère une réponse plus rapide que PI88788 aux NKS (Klink *et al.*, 2010). Chez les nématodes endoparasites migrants comme *P. alleni*, la résistance de l'hôte est très limitée (Peng et Moens, 2003; Yu *et al.*, 2012). Comparativement aux nématodes sédentaires comme les NKS, les *Pratylenchus* n'induisent pas la formation de sites nourriciers spécialisés (Peng et Moens, 2003). Leur développement ne dépend donc pas de la prise de contrôle des cellules de plantes. Or, la plupart des gènes de résistance ciblent les protéines impliquées dans ce processus. Il n'est donc pas surprenant qu'aucune source de résistance complète ne soit connue. Par contre, d'après nos résultats, les cultivars résistants au NKS permettraient une certaine réduction de la reproduction de *P. alleni* lorsque comparée avec le cultivar sensible dans les conditions T2 et T3. Il est difficile d'attribuer ce résultat à la présence des gènes de résistance, cela pourrait aussi être un effet de cultivar. Des tests avec d'autres cultivars sensibles et d'autres cultivars résistants commerciaux devront donc être réalisés afin de confirmer ce résultat.

Les réductions de 19 à 58% du poids racinaires causées par *P. alleni* soutiennent les résultats obtenus par Ferris et Bernard (1962) qui ont observé une diminution moyenne de 25% du poids racinaire des soyas en présence de *P. alleni* lors d'essai en serres. Toutefois, ces

diminutions n'indiquent pas si elles pourraient causer des pertes de rendement, mais, comme le suggèrent Ferris et Bernard (1962), en conditions en champs, où les nutriments et l'eau sont des facteurs limitants, les dommages causés aux racines devraient se refléter par des pertes de rendement.

3.6 Conclusion

Cette étude sur la reproduction de *P. alleni* sur trois cultivars de soya soumis à trois conditions climatiques différentes simulant les conditions actuelles et prévues pour les horizons 2046-2065 et 2081-2100 a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur son taux de reproduction. Les résultats indiquent que les changements climatiques permettront à *P. alleni* de se reproduire davantage que dans les conditions actuelles ce qui pourrait l'avantager pour sa colonisation dans de nouvelles régions de production de soya.

Chapitre 4 : Détection et quantification des nématodes des lésions *Pratylenchus alleni* et *P. penetrans* par PCR quantitative

4.1 Résumé

La qPCR permet l'identification et la quantification d'une séquence ADN cible par utilisation d'amorces et de sondes fluorescentes spécifiques. Cette approche a déjà été utilisée pour la détection et quantification de plusieurs espèces de nématodes phytoparasites du genre *Pratylenchus*. Cette présente étude visait à développer une méthodologie qPCR pour différencier et quantifier simultanément les nématodes *P. penetrans* et *P. alleni* qui partagent plusieurs hôtes communs. Pour leur identification, une paire d'amorces et une sonde TaqMan associée avec le fluorophore CY5 pour *P. alleni* et FAM pour *P. penetrans* ont été développée et se sont avérées spécifiques à la région D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S). Un témoin interne associé avec le fluorophore HEX a aussi été développé pour assurer la détection de faux négatifs causés par les inhibiteurs de PCR. Par la suite, la possibilité de mélanger l'ADN de *P. alleni*, *P. penetrans* et le contrôle interne a été validée. Pour la quantification des deux espèces, une courbe standard en nombre de nématodes respectant les critères de performance nécessaires à son utilisation a été réalisée pour chaque espèce. La méthodologie développée a ensuite été testée en comparant la méthode qPCR avec le dénombrement visuel. Les résultats obtenus montrent que la méthode développée permet de détecter et quantifier simultanément avec succès les populations de *P. alleni* et *P. penetrans*.

4.2 Introduction

Une identification et une quantification précises des nématodes ravageurs sont d'une importance majeure pour le développement de stratégies de contrôle. Or, l'identification morphologique des nématodes nécessite une grande expertise et beaucoup de temps. Pour remédier à la situation, de nombreuses méthodes d'identification moléculaire basées sur la méthode PCR ont été développées tels le SCAR, RFLP, RAPD ou le qPCR (Szalanski *et al.*, 1997; Fourie *et al.*, 2001; Adam *et al.*, 2007; Braun-Kiewnick *et al.*, 2016). L'une d'entre elles, la qPCR, s'est avérée plus prometteuse pour les nématodes phytoparasites spécialement quant à sa rapidité d'utilisation et sa capacité à quantifier tous les stades de développement (Min *et al.*, 2012). La PCR quantitative, ou qPCR, repose sur l'amplification et la détection d'une séquence cible par l'utilisation d'amorces et de sondes moléculaires spécifiques. Plusieurs méthodologies qPCR ont été développées pour des nématodes du genre *Pratylenchus* dont *P. neglectus* (Yan *et al.*, 2013), *P. thornei* (Yan *et al.*, 2012), *P. xiae* (Berry *et al.*, 2008) et *P. penetrans* (Sato *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2011; Goto *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2012; Mokrini *et al.*, 2013).

Le genre *Pratylenchus* regroupe plus de 68 espèces et se classe au troisième rang des nématodes ayant le plus d'impacts au niveau économique sur les productions agricoles mondiales derrière les nématodes des nodosités et à kystes (Castillo et Vovlas, 2007). Dans l'Est canadien, *P. penetrans*, est le *Pratylenchus* le plus répandue et le plus dommageable des cultures. Depuis 2011, la découverte d'une espèce exotique de *Pratylenchus* au Canada est venue modifier la gestion des espèces de ce genre (Bélair *et al.*, 2013). Comme ces deux

nématodes sont presque impossibles à distinguer morphologiquement l'un de l'autre, le développement d'une méthode qPCR serait, entre autres, d'une grande utilité pour leur identification, mais aussi pour le suivi du déplacement de *P. alleni* vers d'autres régions agricoles et pour une gestion efficace de ces nématodes.

L'objectif de cette étude est de développer un protocole standardisé de détection et de quantification par qPCR de *P. alleni* et *P. penetrans*, deux nématodes pouvant être retrouvés simultanément dans un champ agricole. Pour ce faire, des marqueurs moléculaires spécifiques ont été développés et des courbes standards ont été réalisées, analysées et validées.

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Développement d'amorces et de sondes spécifiques à *P. alleni* et *P. penetrans*

Un alignement *in silico* de séquences de la région D2/D3 de la grande sous-unité ribosomale (28S) de neuf espèces de *Pratylenchus* a été généré en utilisant la fonction ClustalW du logiciel BioEdit (version 7.2.5; Hall, 1999). Cet alignement a permis d'identifier une région variable entre les espèces alignées permettant le développement des amorces et sondes moléculaires spécifiques à *P. alleni* et *P. penetrans* (Tableau XIII et figures 10 et 11). Avec les séquences identifiées, plusieurs choix d'amorces et sondes potentielles ont été développées pour chaque espèce avec le logiciel PrimerQuest Tool (<http://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>).

Les séquences des amorces et sondes potentielles ont été comparées à la base de données GenBank afin de s'assurer qu'elles n'étaient pas présentes chez d'autres espèces de nématodes communs de l'agriculture de l'Amérique du nord (Blastn, NCBI,

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Par la suite, les séquences retenues ont été importées dans OligoAnalyzer afin de déterminer leur potentiel de formation de structures secondaires, d'homodimères et d'hétérodimères en vérifiant les valeurs de stabilité des duplex (ΔG) et afin de s'assurer d'avoir une température d'appariement (T_m) semblable pour les deux espèces (<https://www.idtdna.com/calc/analyze/>). Finalement, une paire d'amorces et une sonde ont été sélectionnées pour chacune des espèces (Tableau XIV).

Tableau XIII: Liste des espèces de *Pratylenchus* utilisées pour les alignements *in silico* et leur numéro d'accèsion de GenBank (NCBI).

Espèce	Numéro d'accèsion (GenBank)
<i>P. alleni</i>	JX081545
<i>P. penetrans</i>	JQ003987
<i>P. bachyurus</i>	HQ197923
<i>P. zae</i>	JN020929
<i>P. loosi</i>	JN091970
<i>P. vulnus</i>	JQ003992
<i>P. pratensis</i>	AM231935
<i>P. thornei</i>	EU130881
<i>P. crenatus</i>	EU130853

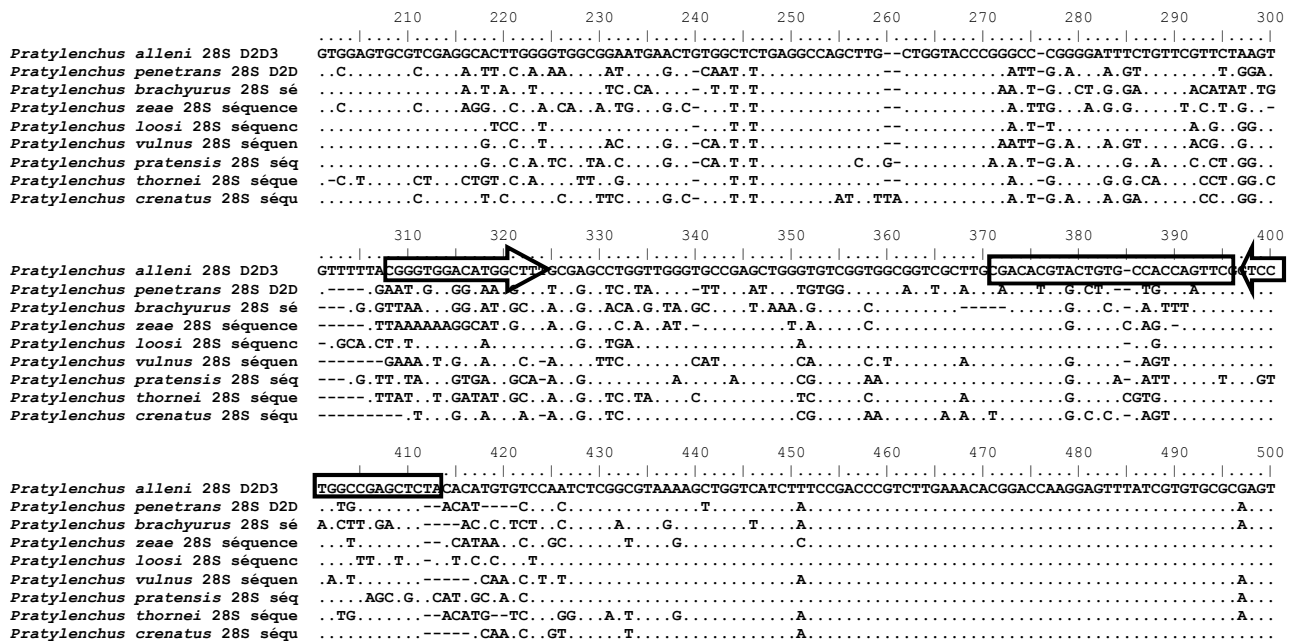


Figure 10: Alignements multiples des séquences D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S) de neuf espèces de *Pratylenchus*. Les amorces et la sonde de *P. allenii* sont identifiées dans les encadrés. Les points représentent des nucléotides identiques à la séquence de référence, soit *P. allenii* et les tirets représentent des brèches ou *gaps* (en anglais).

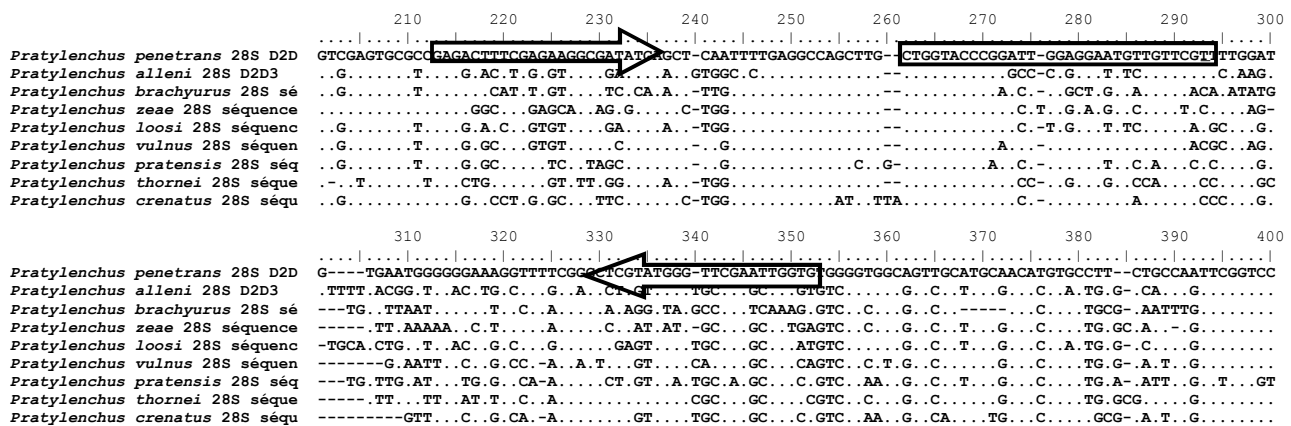


Figure 11: Alignements multiples des séquences D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S) de neuf espèces de *Pratylenchus*. Les amorces et la sonde de *P. penetrans* sont identifiées dans les encadrés. Les points représentent des nucléotides identiques à la séquence de référence, soit *P. penetrans* et les tirets représentent des brèches ou *gaps* (en anglais).

Tableau XIV: Séquences des amorces et sondes développées pour *Pratylenchus alleni* et *P. penetrans*.

Espèces	Amorces sens (5'-3')	Amorces anti-sens (5'-3')	Sondes (5'-3')	Fluorochrome émetteur ¹	Taille de l'amplicon (pb)
<i>P. alleni</i>	CGGGTGGACATGGCTTT	GTAGAGCTCGGCCAGGA	CGACACGTACTGTGCC	CY5	106
<i>P. penetrans</i>	GAGACTTTCGAGAAGGCGATATG	CACCAATTCGAACCCATACGA	CCCGGATTGGAGGAATGTTGTCGT	FAM	131

¹Les fluorochromes émetteurs CY5 et FAM (5-carboxyfluorescéine) sont localisés à l'extrémité 5' de la sonde

4.3.2 Culture *in vitro* de *P. alleni* et *P. penetrans*

Des nématodes de *P. alleni* et *P. penetrans* ont été reproduits *in vitro* en cabinets de croissance afin d'obtenir des individus pour les tests décrits dans les paragraphes suivants. Pour ce faire, les deux espèces ont été reproduites séparément sur des racines de maïs cv. Extra Early Super Sweet (Stokes Seeds Ltd., Thorold, Ontario) stériles dans 2 boîtes de pétri, tel que décrit au chapitre 2, contenant un milieu de culture constitué de Phytigel (6 g/L) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), de sucrose (20 g/L) et de Gamborg B-5 (3,2 g/L) (*basal medium with minimal organics*, Sigma-Aldrich). Les boîtes de pétri contenant *P. penetrans* ou *P. alleni* ont respectivement été incubées à 20°C et 30°C, les températures optimales de développement de chacune des espèces, durant 3 mois à l'obscurité. Afin de récupérer les nématodes, les géloses ont été coupées en morceaux de 1 cm² et déposées sur un tamis 75 µm imbriqué sur un tamis 20 µm. Les morceaux ont été rincés et dilués avec de l'eau du robinet et les nématodes ont ainsi été récupérés sur le tamis de 20 µm. Les nématodes ont ensuite été transférés dans une coupelle à binoculaire afin d'être isolés manuellement.

4.3.3 Extraction ADN

Pour les tests décrits dans les paragraphes suivants et nécessitant de l'ADN génomique, les nématodes isolés manuellement ont été congelés à -80°C. Les nématodes congelés ont été lyophilisés pour une période de 24 heures à l'aide du lyophilisateur Triad (Labconco, Kansas City, Mo, É.U.). L'ADN génomique a été extrait des lyophilisats avec la trousse d'extraction DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN Inc., Valencia, Ca, É.-U.) suivant le protocole du fabricant. Pour la dernière étape de l'extraction, l'ADN a été élué deux fois consécutives avec 50 µL de tampon AE (QIAGEN Inc.) pour un volume d'élution total de 100 µL. Les échantillons ont été conservés à -20°C avant d'être utilisés dans les tests suivants.

4.3.4 Contrôle interne pour la détection d'inhibiteurs

Afin de détecter la présence d'inhibiteurs (contaminants) dans les extraits d'ADN, un contrôle interne a été ajouté dans chaque réaction de chacun des tests à l'exception du test de spécificité des amorces avec le fluorophore SYBR Green. Le contrôle interne utilisé est une séquence d'oligonucléotides doubles brins synthétique (*gBlocks Gene Fragments^{MD}*, IDT) qui est amplifiée à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques et détectée par une sonde TaqMan émettant une fluorescence (HEX) d'une longueur d'onde différente de celles pour détecter *P. alleni* (CY5) et *P. penetrans* (FAM) (Tableau XV). L'inhibition a été détectée en comparant le cycle de quantification (Cq) obtenu dans les témoins négatifs (eau stérile) avec celui des échantillons de nématodes. Une différence plus petite qu'une valeur de Cq de 1 entre les échantillons de nématodes et les témoins négatifs devait être obtenu pour considérer que l'essai est concluant. Si la différence de Cq était supérieure à 1, le niveau d'inhibition était considéré trop élevé pour offrir une estimation correcte.

Tableau XV : Séquences des amorces et de la sonde permettant l'amplification et la détection du contrôle interne.

Amorces	Séquences amorces (5'-3')	Séquence sonde (5'-3')	Fluorochrome émetteur ¹
Sens	CTGAGTAGCCACGTTATTATC	CGCACTTGTCTACACCCTTCATAC	HEX
Anti-sens	GCGAACAACCTAAGTTGATTG		

¹Le fluorochrome émetteur HEX (6-carboxy-1,4-dichloro-2',4', 5', 7'-tetrachlorofluorescéine) est localisé à l'extrémité 5' de la sonde

4.3.5 qPCR

Tous les tests ont été réalisés avec le modèle Mx3000P QPCR Systems de Stratagene (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, É.-U.). Pour la spécificité des amorces avec sondes SYBR green, les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20 µL contenant 10 µL de tampon TaqMan PCR (2x), 250 nM de chaque amorce pour *P. alleni* et *P. penetrans*, 2 µL du colorant SYBR green (10x), 1 µL d'ADN à amplifier et de l'eau stérile pour compléter. Pour chaque espèce, le test a été réalisé en triplicata et trois témoins négatifs (eau stérile) ont été inclus afin de déceler une éventuelle contamination. Les conditions d'amplification du thermocycleur sont présentées au tableau XVI.

Tableau XVI: Cycle thermique d'amplification au qPCR en SYBR green pour générer une courbe de dissociation.

Étapes	Durée	Température (°C)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	10 min	95	1
Dénaturation	30 sec	95	45
Appariement/Élongation	1 min	62	45
Dénaturation	1 min	95	1
Courbe de dissociation	Gradient de 55 à 95		

Pour les autres tests dont l'efficacité des courbes standards, la vérification technique, l'attribution d'un nombre de larves à un nombre de copies, le multiplexe et la confirmation finale de la méthode, les réactions ont été réalisées dans un volume final de 20 µL contenant 10 µL de tampon Quantifast Multiplex PCR (2X), 0,4 µL de solution du fluorochrome de référence ROX (6-carboxyl-X-rhodamine ; 50X), 0,25 µL d'albumine de sérum bovin (BSA à 10 mg/µL), 250 nM d'amorces sens et anti-sens et des sondes TaqMan des deux espèces, 300 nM des amorces du contrôle interne, 375 nM de la sonde du contrôle interne, 2000 copies du contrôle interne, 1 µL d'ADN et de l'eau stérile pour compléter. Trois témoins négatifs (eau stérile) ont été inclus dans chaque essai. Le seuil de détection de l'appareil (*threshold* en anglais) a été fixé afin de pouvoir comparer les données entre les essais. Les conditions d'amplification sont décrites au tableau XVII.

Tableau XVII: Cycle thermique d'amplification au qPCR avec sonde TaqMan.

Étape	Durée	Température (°C)	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	5 min	95	1
Dénaturation	1 min	95	45
Appariement/Élongation	30 sec	62	45

4.3.6 Tests des couples d'amorces et des sondes par qPCR simplexe

4.3.6.1 Spécificité des amorces avec sondes SYBR green

Afin de tester la spécificité des amorces, l'ADN génomique de 100 individus de *P. alleni* et de 100 individus de *P. penetrans* a été extrait puis amplifié séparément par qPCR. Des courbes de dissociation ont été générées suite à l'amplification pour détecter de potentielles formations

de dimères ou de produits d'amplification non spécifiques. Ces courbes ont été illustrées par la dérivée première de la fluorescence en fonction de la température (55°C à 95°C).

4.3.7 Courbes standards

4.3.7.1 Développement d'oligonucléotides synthétiques

Une méthode de quantification efficace repose sur l'utilisation d'une courbe standard composée d'oligonucléotides de concentrations connues. Dans la présente étude, des séquences d'ADN doubles brins de *P. alleni* et *P. penetrans* contenant la région à amplifier ont été synthétisées artificiellement (*gBlocks Gene Fragments^{MD}*, IDT). Ces oligonucléotides lyophilisés ont été re-suspendus dans un volume de tampon TE (Tris-EDTA 1x; 10 mM Tris et 1 mM EDTA; pH 8) permettant d'obtenir 2×10^9 copies/ μL .

4.3.8 Critères de performance des courbes standards

4.3.8.1 Efficacité des courbes standards: linéarité, efficacité et sensibilité

Les oligonucléotides synthétiques de référence de chaque espèce ont été dilués dans de l'eau distillée stérile afin d'obtenir le premier point (D2) de la courbe standard contenant 10^7 copies/ μL . Une dilution en série (1/10) a ensuite été réalisée afin d'obtenir sept autres points dont le dernier (D9) contenait 1 copie/ μL . Les détails du calcul de chaque point de la dilution sont illustrés au tableau XVIII. Ces deux dilutions en série serviront de gammes d'étalonnage où le nombre de copies sera associé à une quantité de nématodes.

Afin de vérifier si les courbes standards respectaient les critères d'acceptation et les exigences de performance d'une courbe standard valide, des régressions linéaires illustrant les valeurs des C_q en fonction du logarithme en base 10 du nombre de copies ont été réalisées et

l'équation de la droite, l'efficacité d'amplification (E , %) et le coefficient de détermination (R^2) pour chaque courbe ont été calculés. Le R^2 est un indicateur qui permet de juger de la qualité d'une régression linéaire et peut être influencé par la précision de la dilution en série et la sensibilité de l'essai en général. Un $R^2 \geq 0,985$ est considéré acceptable pour des courbes standards (Broeders *et al.*, 2014). Quant à la pente de la courbe, elle est utilisée pour déterminer l'efficacité de la réaction. Si l'efficacité est de 100%, la pente de régression linéaire est d'environ -3,32 ce qui indique que la quantité d'amplicons double à chaque cycle d'amplification. Une courbe acceptable du logarithme du nombre de copies et du cycle d'amplification génère une pente variant entre -3,1 et -3,6 et a une efficacité de 90-110% (Bustin *et al.*, 2009).

La sensibilité de la courbe est aussi un critère important. Elle réfère au nombre minimum de copies qui peut être mesuré avec précision. La sensibilité des deux courbes a été déterminée en testant la reproductibilité de l'amplification des dilutions D8 et D9. La sensibilité est aussi exprimée comme la limite de détection (LOD; *limit of detection*) (Bustin *et al.*, 2009).

Tableau XVIII: Calculs des dilutions en série des oligonucléotides synthétiques de *P. allenii* et *P. penetrans*.

Dilution	Source d'ADN	Volume ADN (μL)	Volume d'eau (μL)	Nombre copies/μL
D1				2000000000
D2	D1	1	199	10000000
D3	D2	100	900	1000000
D4	D3	100	900	100000
D5	D4	100	900	10000
D6	D5	100	900	1000
D7	D6	100	900	100
D8	D7	100	900	10
D9	D8	100	900	1

4.3.8.2 Vérification technique des courbes standards: répétabilité et reproductibilité

Les courbes standards doivent répondre à certains autres critères de performance pour être utilisées. La précision du pipetage de la courbe, l'un des principaux points pour une quantification réussie, a été vérifiée par la fidélité intra-essai (ou intra-run; répétabilité). Trois réplicats techniques des dilutions D4 à D7 des courbes ont été réalisées dans un même essai au qPCR (l'utilisation des points D4 à D7 est expliquée dans la section résultat). La variation a été estimée avec l'écart-type des Cq générés à partir des réplicats pour chacun des points de la courbe. De plus, comme l'impact de la variation peut être difficile à évaluer en raison de la nature exponentielle des Cq, les écarts-types sur les Cq ont été utilisés afin d'estimer la variation du nombre de copies basé sur l'équation de Rutledge et Côté (2003) :

$$\pm \% \text{ variation du nombre de copies} = [(E + 1)^{ET} - 1] \times 100\% \quad (\text{équation 1})$$

où ET est l'écart-type des Cq généré par les réplicats techniques et E est l'efficacité de la réaction.

En ce qui concerne la variation inter-essais (ou inter-run; reproductibilité) de l'amplification sous les conditions expérimentales utilisées, trois lectures qPCR séparées de triplicata techniques ont été réalisées avec les quatre points de dilutions des courbes synthétiques (D4 à D7). La variation inter-essais a été estimée avec l'écart-type et l'équation (1) décrite précédemment.

4.3.8.3 Comparaison de la biomasse des nématodes et le nombre de copies des gènes ribosomiques

Les courbes d'abondance de nématodes ont été réalisées avec les *Pratylenchus* produits dans les milieux de cultures *in vitro* décrits précédemment. Pour chacune des espèces, des microtubes 1,5 ml contenant 5, 10, 25, 50 et 100 individus dans 100 µl d'eau du robinet ont été préparés en triplicata biologique. L'ADN a ensuite été extrait comme mentionné précédemment.

Trois essais qPCR différents ont été réalisés avec trois réplicats techniques des dilutions D4 à D7 des courbes synthétiques et les trois réplicats biologiques des extraits d'ADN de différents nombres d'individus de chacune des deux espèces (Figure 12). Pour chacun des qPCR, le nombre moyen de copies a été relié aux nombres moyens d'individus. Une courbe moyenne a été réalisée avec les trois courbes résultantes afin de prendre en compte les variations associées à la technique qPCR. La courbe obtenue a été illustrée graphiquement par le cycle d'amplification (Cq) en fonction du nombre de nématodes.

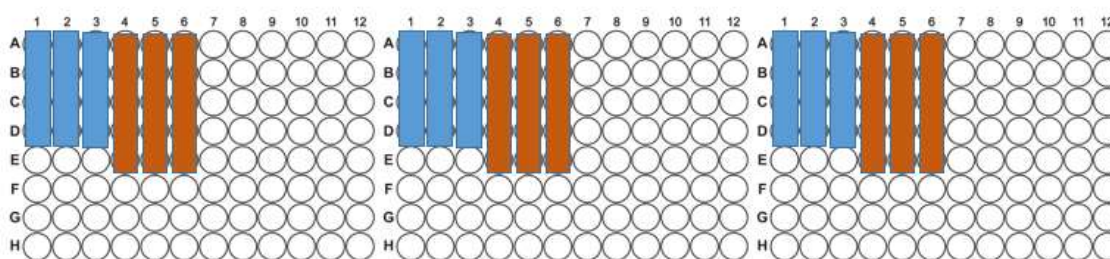


Figure 12: Dispositif expérimental pour l'association du nombre de nématodes à un nombre de copies. Les sections en bleu représentent les trois réplicats techniques des points de dilution D4 à D7. Les sections en brun représentent les trois réplicats biologiques des cinq points de la courbe en nombre de nématodes.

Les statistiques sommaires comme la moyenne et l'écart-type ainsi que les limites inférieures et supérieures du nombre de nématodes ont été calculées pour chaque point de dilution des courbes et sur les paramètres d'équation des courbes (n=3). Les coefficients de variation ont aussi été calculés pour la pente, l'efficacité des courbes standards, le R^2 et l'ordonnée à l'origine des courbes.

4.3.9 Multiplexe

Par son approche plus économique qui nécessite moins de réactifs et de temps, la possibilité de multiplexer, donc d'amplifier ensemble, l'ADN de *P. alleni* et *P. penetrans* et le contrôle interne a été testée. Pour ce faire, les ADN cibles de 100 adultes *P. alleni* et *P. penetrans* et 2000 copies du contrôle ont été amplifiés seuls (simplexe) et ensemble (multiplexe) sur une même plaque qPCR de 96 puits. Chaque amplification a été réalisée en triplicata.

Les valeurs de Cq obtenues en multiplexe ont été comparées à celles obtenues en simplexe à l'aide du test de t de Student. Les valeurs obtenues multiplexe ne devaient pas être significativement différentes de celles obtenues en simplexe pour considérer le multiplexage possible (Bio-Rad Laboratories Inc., 2006).

4.3.10 Confirmation de la méthode

Afin de comparer l'exactitude et la linéarité de la méthode à différentes concentrations d'ADN, des échantillons contenant différentes quantités de nématodes ont été testés. Le nombre d'individus a été dénombré à la loupe binoculaire. Ces échantillons ont ensuite été lyophilisés et l'ADN a été extrait par la méthode d'extraction décrite précédemment. L'ADN a

ensuite été quantifié par qPCR avec les amorces et sondes que nous avons développées. La quantité de nématodes dénombrée à la loupe binoculaire a été comparée graphiquement en fonction de la quantité estimée par qPCR. La méthode a été validée pour *P. alleni* et *P. penetrans*.

4.3.11 Analyses statistiques

Les régressions linéaires du nombre de copies de la séquence cible ou du nombre de nématodes en fonction du cycle d'amplification ont été réalisées avec le logiciel MxPRO QPCR (version 4.10) pour Mx3000P. Le test de t de Student utilisé pour comparer les valeurs de Cq obtenues en multiplexe à celles obtenues en singleplex a été réalisé avec le logiciel XLSTAT 2016 (Addinsoft, New York, É.-U).

4.4 Résultats

4.4.1 Vérification des couples d'amorces et sondes par qPCR simplexe

4.4.1.1 Spécificité des amorces

La comparaison des séquences d'amorces dans la base de données GenBank a confirmé la spécificité des amorces pour chacune des espèces à l'étude. De plus, l'analyse des courbes de dissociation (SYBR green) a confirmé que les amorces sont spécifiques et n'interagissent pas entre elles. À 62°C, température optimale d'appariement des amorces, la formation d'une courbe unimodale indique qu'aucune formation de produits non spécifiques n'est détectée autant pour *P. penetrans* que *P. alleni* (Figures 13 et 14). Les températures de dissociation sont respectivement d'environ 78,1°C pour *P. penetrans* et 84,1°C pour *P. alleni*.

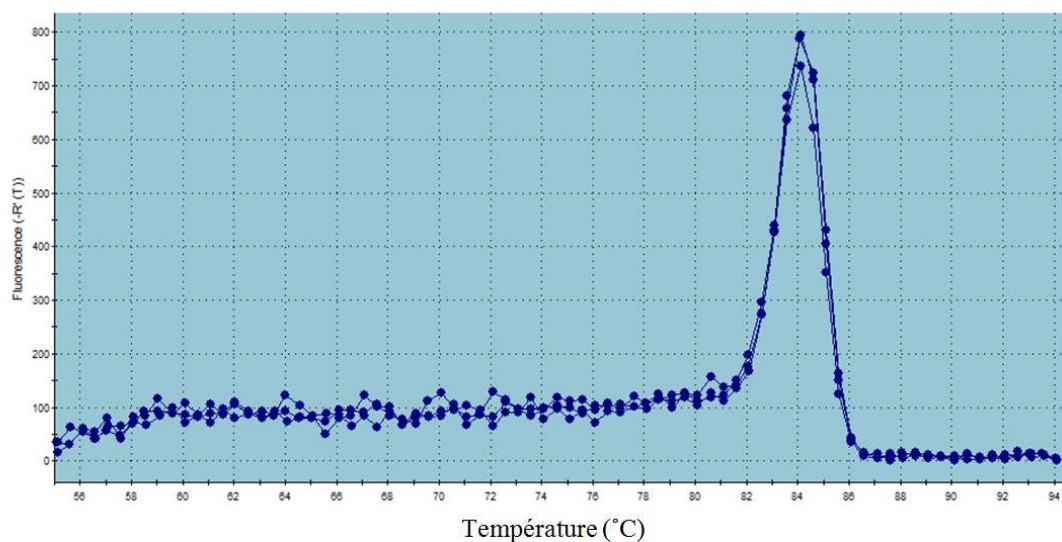


Figure 13: Courbes de dissociation (dérivé primaire de la fluorescence en fonction de la température) montrant l'amplification spécifique de *P. allenii* soumise à une température d'appariement de 62°C (Trois réplicats techniques).

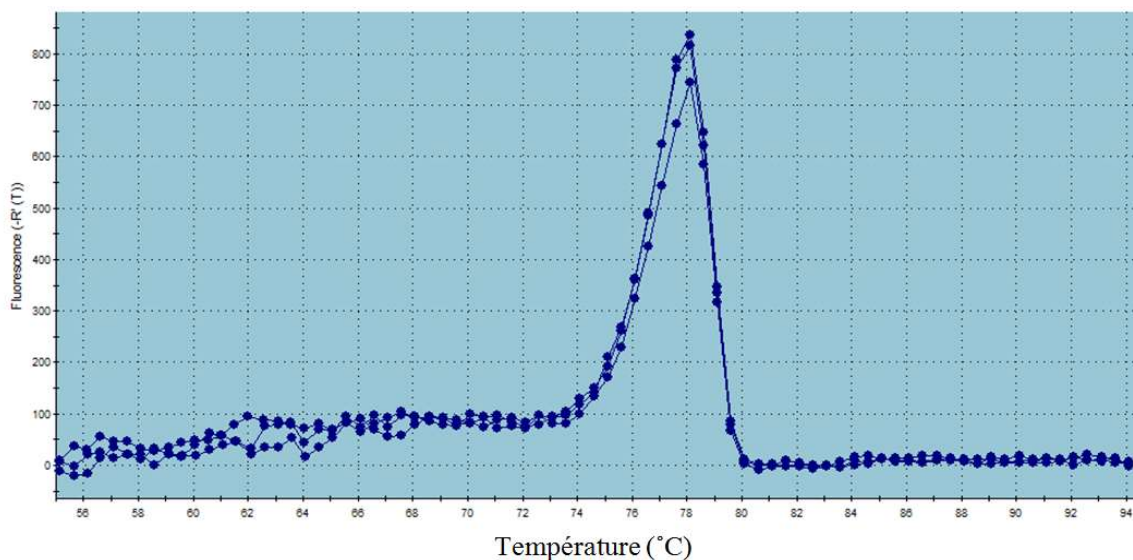


Figure 14: Courbes de dissociation (dérivé primaire de la fluorescence en fonction de la température) montrant l'amplification spécifique de *P. penetrans* soumise à une température d'appariement de 62°C (Trois réplicats techniques).

4.4.2 Courbes standards synthétiques

4.4.2.1 Sensibilité (limite de détection)

La plus faible concentration à laquelle une mesure de fluorescence peut être détectée avec fiabilité était de 10 copies/ μL (point de dilution D8) à la fois chez *P. alleni* et *P. penetrans*. Cette concentration permet de détecter avec précision un seul nématode. La dilution D9 (1 copie/ μL) n'était détectable que dans 50% des lectures qPCR.

4.4.2.2 Confirmation technique : répétabilité et reproductibilité

Pour la confirmation technique intra-essai des courbes standards, chaque dilution D4 à D7 a été amplifiée en triplicata technique dans une même lecture qPCR. Globalement, les écarts-types des Cq des points de la courbe variaient entre 0,06 et 0,22 cycle pour *P. alleni* et entre 0,03 et 0,18 cycle pour *P. penetrans* (Tableau XIX). Cela correspondait à une variation du nombre de copies entre 4,24 et 16,46% pour *P. alleni* en utilisant une efficacité d'amplification de 101,63%. Pour *P. penetrans* cela correspondait à une variation entre 2,10 et 13,28% en utilisant une efficacité d'amplification de 97,67% (Tableau XX).

Tableau XIX: Variabilité intra-essai de la courbe standard synthétique de *P. alleni* basée sur la moyenne et l'écart-type des Cq et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Point de la courbe (dilution)	Nombre de copies/ μL	Cq moyen	Écart-type	Variation du nombre de copies (%)
D4	100000	20,40	0,06	4,24
D5	10000	23,71	0,14	10,18
D6	1000	26,83	0,11	7,92
D7	100	30,70	0,22	16,46

Tableau XX: Variabilité intra-essai de la courbe standard synthétique de *P. penetrans* basée sur la moyenne et l'écart-type des Cq et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Point de la courbe (dilution)	Nombre de copies/ μ L	Cq moyen	Écart-type	Variation du nombre de copies (%)
D4	100000	20,83	0,07	4,97
D5	10000	24,21	0,03	2,10
D6	1000	27,68	0,08	5,70
D7	100	30,77	0,18	13,28

Pour la vérification inter-essais, les écarts-types des Cq des points de la courbe variaient entre 0,06 et 0,41 cycle pour *P. allenii* ce qui correspondait à une variation du nombre de copies variant entre 4,30 et 33,31% (Tableau XXI). Pour *P. penetrans*, les écarts-types variaient entre 0,23 et 0,54 cycle ce qui correspond à une variation de 16,97 à 44,48% du nombre de copies (Tableau XXII).

Tableau XXI: Variabilité inter-essais de la courbe standard synthétique de *P. allenii* basée sur la moyenne et l'écart-type et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Point de la courbe (dilution)	Nombre de copies/ μ L	Cq moyen	Écart-type	Variation du nombre de copies (%)
D4	100000	20,94	0,11	8,02
D5	10000	24,17	0,12	8,78
D6	1000	27,40	0,06	4,30
D7	100	30,82	0,41	33,31

Tableau XXII: Variabilité inter-essais de la courbe standard synthétique de *P. penetrans* basée sur la moyenne, l'écart-type et le pourcentage (%) de variation du nombre de copies pour chacune des dilutions D4 à D7 (n=3).

Point de la courbe (dilution)	Nombre de copies/ μ L	Cq moyen	Écart-type	Variation du nombre de copies (%)
D4	100000	20,73	0,23	16,97
D5	10000	24,12	0,41	32,23
D6	1000	27,55	0,54	44,48
D7	100	30,85	0,36	27,80

4.4.2.3 Attribution d'une quantité de nématodes à un nombre de copies

La figure 15 illustre l'étalement des courbes standards (synthétiques et génomiques) de *P. penetrans*. L'étalement des courbes standards pour *P. allenii* (non présenté) est semblable à celle de *P. penetrans*, formant ainsi deux régressions linéaires négatives. Pour les deux espèces, les quatre points de dilution de la courbe synthétique sélectionnée (D4 à D7) permettaient d'englober l'étendue de notre courbe en nombre de nématodes. Étant superflus, les autres points ont été exclus des tests et des courbes standards.

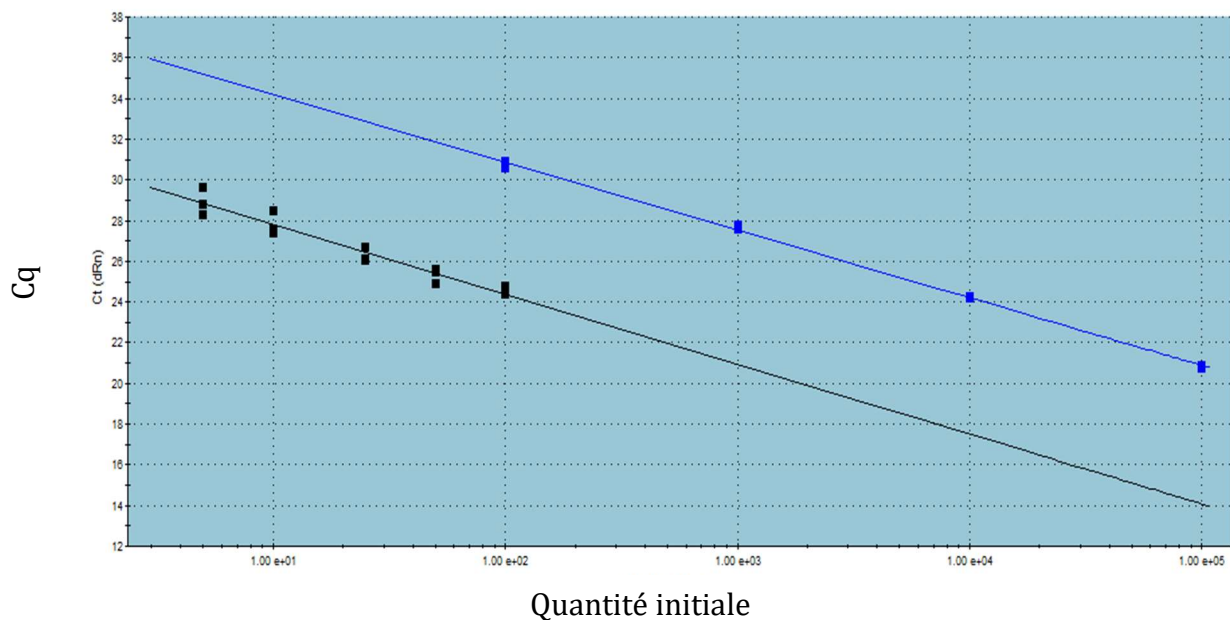


Figure 15: Exemple de l'étalement des courbes standards génomiques et synthétiques de *P. penetrans*. La courbe bleue représente les trois répliquats techniques de la courbe synthétique (D4 à D7). La courbe noire représente les trois répliquats biologiques de 5, 10, 25, 50, 100 nématodes.

Les courbes obtenues suite aux projections des courbes en nombre de nématodes sur celles en nombre de copies sont illustrées aux figures 16 et 17. Pour ces deux courbes, on observe une relation directe entre le nombre de nématodes et les Cq. La courbe générée (axe y : cycle de quantification, et axe x : log du nombre de nématodes dans un volume d'extraction de 100 μ L) pour *P. penetrans* suit l'équation $y = -3,38 \log(x) + 37,65$ avec une efficacité (*E*) de 97,67%. Celle générée pour *P. allenii* suit l'équation $y = -3,29 \log(x) + 37,33$ avec une efficacité (*E*) de 101,63%.

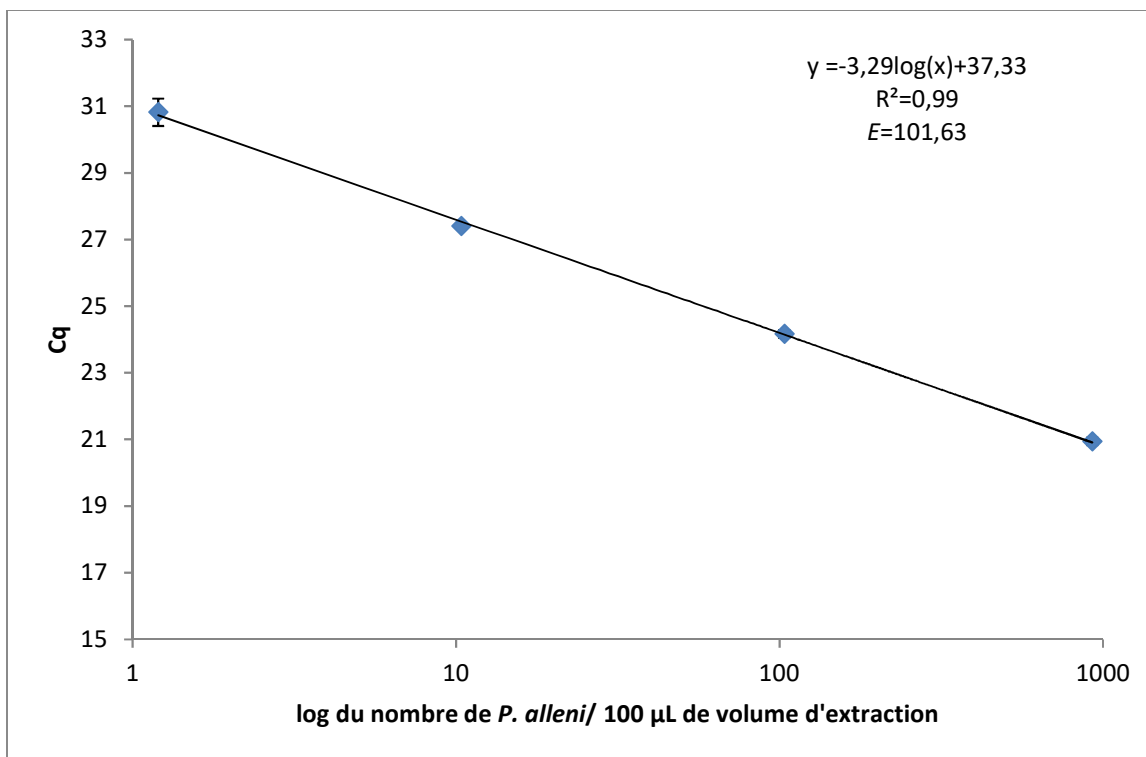


Figure 16: Courbe standard pour la quantification absolue de *P. allenii* ($\bar{x} \pm \text{écarts-types}$ des Cq) (n=3).

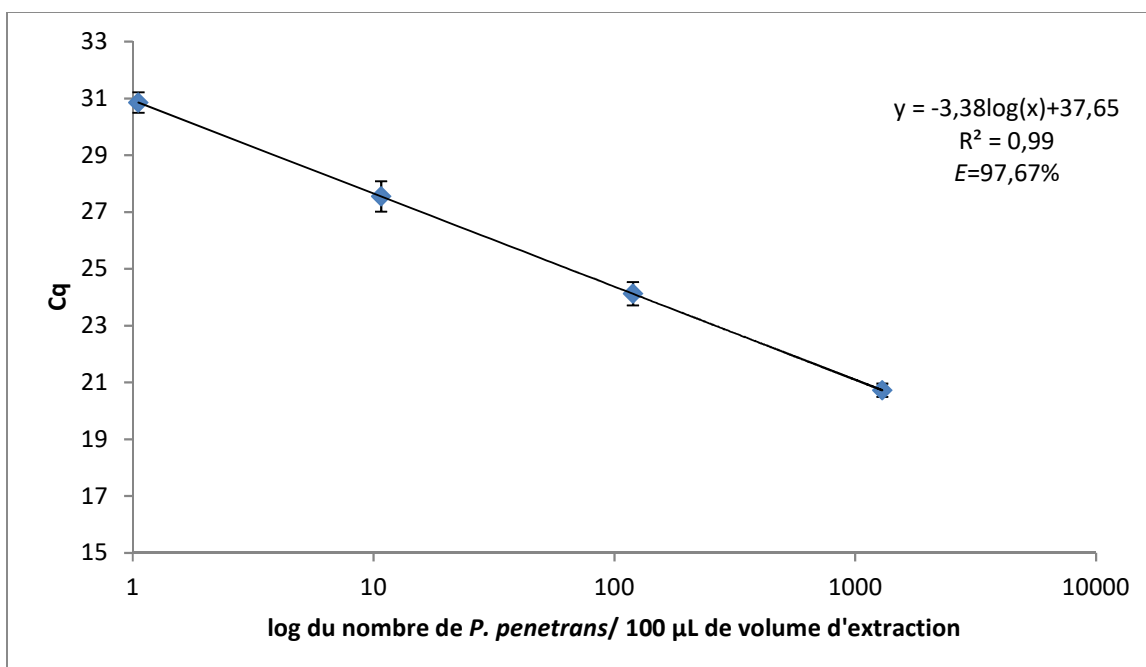


Figure 17: Courbe standard pour la quantification absolue de *P. penetrans* ($\bar{x} \pm$ écarts-types des Cq) (n=3).

4.4.3 Multiplexe

La possibilité de faire des réactions multiplexes, donc d'amplifier les séquences ADN cibles de *P. allenii* et *P. penetrans* et un contrôle interne ensemble dans un même mélange réactionnel, a été testée en comparant les valeurs de Cq obtenues en simplexe avec celles obtenues en multiplexe (Tableau XXIII). Aucune valeur moyenne de Cq obtenue en multiplexe n'était significativement différente de la valeur obtenue en simplexe (Test t de Student, $P > 0,05$, $n = 3$). Ces résultats confirment que *P. allenii* et *P. penetrans* peuvent être détectés et quantifiés ensemble dans ce protocole sans qu'il y ait de mauvais appariements entre les séquences impliquées dans la réaction d'amplification.

Tableau XXIII: Valeurs moyennes des Cq de 100 adultes de *P. alleni*, 100 adultes de *P. penetrans* et 2000 copies du contrôle interne en simplexe et en multiplexe.

Nombre de nématodes		Valeurs moyennes ¹ de Cq \pm \bar{ET} ³		
<i>P. alleni</i>	<i>P. penetrans</i>	<i>P. alleni</i> (CY5)	<i>P. penetrans</i> (FAM)	Contrôle interne ² (HEX)
100 adultes		26,60 \pm 0,17		
100 adultes + 2000 copies du contrôle interne		26,76 \pm 0,02		30,96 \pm 0,23
	100 adultes		26,67 \pm 0,05	
	100 adultes + 2000 copies du contrôle interne		26,72 \pm 0,09	30,61 \pm 0,24
100 adultes	100 adultes	26,88 \pm 0,18	26,78 \pm 0,13	
100 adultes + 2000 copies du contrôle interne	100 adultes + 2000 copies du contrôle interne	26,48 \pm 0,14	26,52 \pm 0,01	30,87 \pm 0,24

¹Les valeurs moyennes de Cq sont la moyenne de trois réplicats techniques. ²La valeur moyenne de Cq de 2000 copies du contrôle interne est de 30,84 \pm 0,38 en simplexe. ³ \bar{ET} =Écart-type.

4.4.4 Confirmation de la méthode

Les figures 18 et 19 montrent la relation entre les quantités de nématodes dénombrées visuellement et celles estimées par qPCR. Ces deux figures présentent des régressions linéaires positives caractérisées par des R² de 0,98 pour *P. alleni* et de 0,97 pour *P. penetrans*.

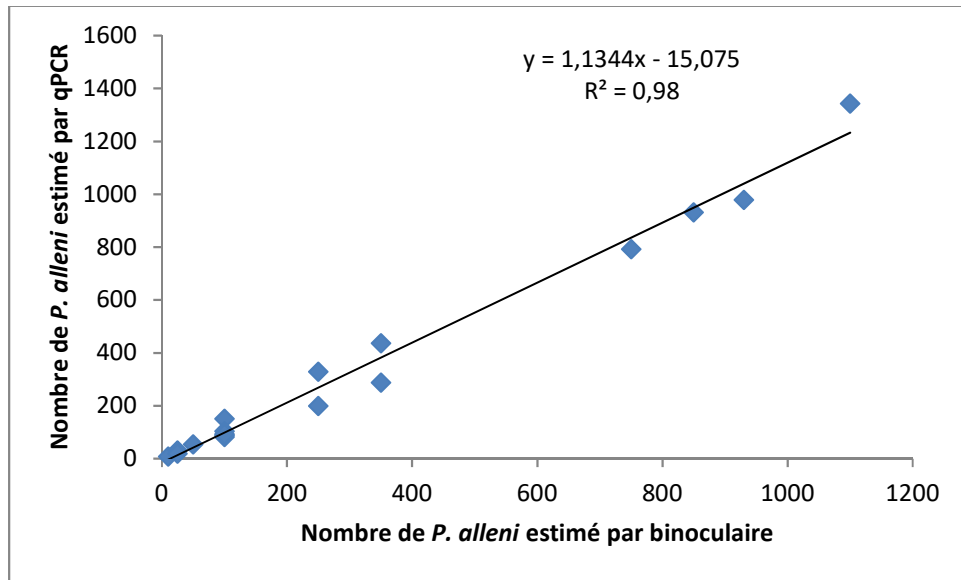


Figure 18: Relation entre le nombre de *P. alleni* dénombré à la loupe binoculaire et le nombre estimé par qPCR.

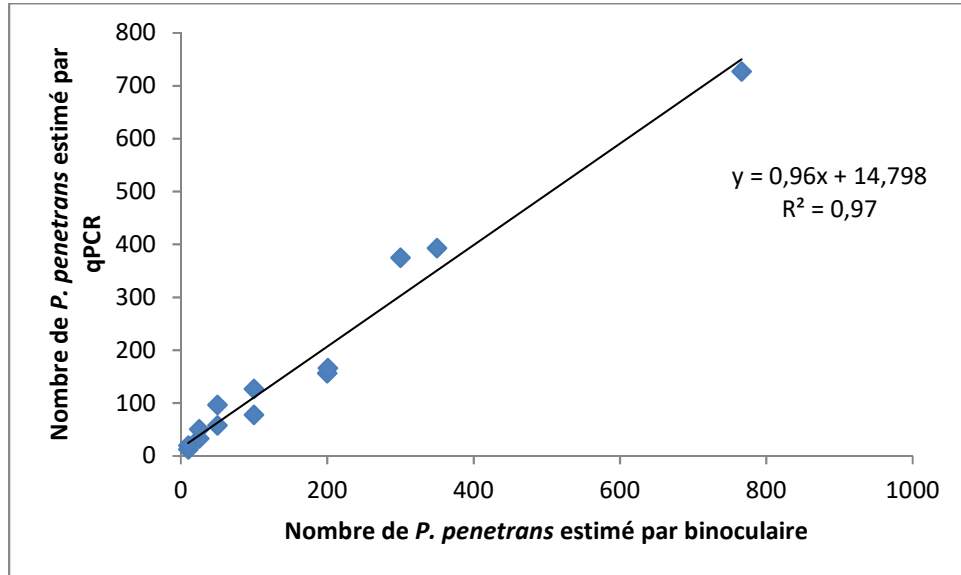


Figure 19: Relation entre le nombre de *P. penetrans* dénombré à la loupe binoculaire et le nombre estimé par qPCR.

4.5 Discussion

Dans cette étude, un protocole de PCR quantitative (qPCR) basé sur la technologie TaqMan, a été développé avec succès afin de pouvoir identifier et quantifier simultanément les populations de *P. alleni* et *P. penetrans*. L'identification du genre *Pratylenchus* à l'espèce en utilisant les critères morphologiques est très complexe et fastidieuse. Nous avons vu au chapitre 2 que *P. alleni* et *P. penetrans* partageaient des plantes hôtes communes pouvant mener à leur présence simultanée dans un même champ agricole. Dans ce même chapitre, nous avons aussi vu que le spectre d'hôtes différait entre ces deux espèces, il est donc essentiel de pouvoir les identifier correctement et rapidement afin de pouvoir, entre autres, suggérer des cultures non-hôtes appropriées pour la rotation.

L'utilisation des régions D2/D3 de la large sous-unité ribosomale (28S) a permis le développement d'amorces et sondes spécifiques capables de discriminer *P. alleni* et *P. penetrans*. L'utilisation de cette région a aussi permis de contourner les difficultés potentielles associées à l'utilisation des régions ITS, régions aussi utilisées pour la détection de certains nématodes (Toyota *et al.*, 2008; Sayler *et al.*, 2012). Les régions ITS peuvent varier en taille chez les espèces du genre *Pratylenchus*, pouvant rendre problématique l'alignement des séquences (De Luca *et al.*, 2011). De plus, les régions ITS peuvent présenter un polymorphisme chez une même espèce, voire un même individu (Waeyenberge *et al.*, 2009; De Luca *et al.*, 2011). La région D2/D3 a déjà été utilisée pour le développement d'amorces spécifiques de plusieurs nématodes et s'est avérée, comme dans la présente étude, une cible fiable (Subbotin *et al.*, 2008; Kumari et Subbotin, 2012; Ye et Giblin-Davis, 2013).

Afin de développer une méthodologie valide et pour obtenir des résultats de qualité, les directives essentielles à la publication d'articles scientifiques sur la méthode qPCR présentées par Bustin *et al.* (2009) ont été suivies, du design expérimental à l'analyse des données. Le développement d'une courbe standard externe synthétique nécessite la détermination de sa répétabilité (variation intra-essai) et de sa reproductibilité (variation inter-essais) afin de déterminer les limites de son application (Pfaffl, 2004). La vérification de la répétabilité et de la reproductibilité selon Bustin *et al.* (2009) doivent être décrites, entre autres, par l'écart-type sur le Cq, par le pourcentage de variation du nombre de copies ou par l'intervalle de confiance sur les Cq (Rutledge et Côté, 2003; Bustin *et al.*, 2009; Svec *et al.*, 2015). Nos résultats indiquent que les courbes sont reproductibles, stables et peuvent être utilisées pour estimer avec précision le nombre d'individus dans un échantillon puisque les valeurs de Cq sont hautement reproductibles sur les quatre ordres de magnitude testés. En ce qui concerne les courbes standards finales utilisées pour la quantification absolue du nombre de *P. penetrans* et *P. allenii*, leur vérification a été réalisée en estimant les coefficients de variation à partir des valeurs moyennes des paramètres des courbes. D'après Pfaffl (2004), des coefficients de variation respectivement de 2-3% et de moins de 10% pour la pente et l'ordonnée à l'origine sont recherchés pour valider une courbe, ce qui valide les courbes de quantification réalisées.

Les courbes standards en nombre de nématodes ont été préparées aléatoirement avec des individus de stades adultes et juvéniles afin qu'elles soient représentatives des stades infectieux que l'on extrait du sol et des racines par méthodes d'extraction standards. Étant donné qu'un adulte est plus gros et possède plus de cellules qu'un juvénile, une différence

dans le nombre de copies de la séquence cible est attendue entre ceux-ci. De fait, Sato *et al.* (2007) ont trouvé des différences entre les valeurs de Cq d'un *P. penetrans* mâle, d'une femelle et d'un juvénile.

Les quatre points de la courbe synthétique utilisés (D4 à D7) ont permis de détecter entre 1 et 1000 nématodes. Le seuil économique pour les *Pratylenchus* est généralement de 1000 par kg de sol, dépendamment des cultures (Olthof, 1987). Ces types de nématodes sont généralement dépistés par la technique de l'assiette de Bearmann sur des échantillons d'environ 100 g de sol. L'étendue de détection de notre méthode qPCR convient donc autant à la quantification de faibles populations, qu'à des valeurs dépassant les seuils de nuisibilité. Comme ces nématodes proviennent du sol, plusieurs contaminants susceptibles d'inhiber la réaction PCR sont souvent extraits en même temps que l'ADN. Ceux-ci peuvent fausser les analyses et mener à de faux négatifs. L'inclusion d'un contrôle interne dans notre essai permet de pallier ce problème et d'améliorer la confiance en nos résultats.

4.6 Conclusion

En résumé, l'application d'une sonde fluorescente TaqMan s'hybridant avec succès sur la région d'ADN cible de *P. alleni* et *P. penetrans* permet une détection et quantification efficace et rapide de ceux-ci. Cette méthode moléculaire sera d'une aide précieuse pour le suivi de *P. alleni* et *P. penetrans*, et afin de proposer des solutions de gestion adaptées.

Chapitre 5 : Discussion générale et conclusion

Les changements climatiques et l'augmentation du commerce international lié à la mondialisation appelle à une attention particulière face aux risques phytosanitaires. Le potentiel de nouvelles introductions de ravageurs et l'accentuation des problèmes indigènes sont à craindre. En effet, les changements climatiques favorisent l'adaptation de certains ravageurs émergents et accroissent leurs impacts négatifs. Afin de faire face à ces nouvelles menaces, on se doit d'être vigilant. La biovigilance est l'étude des effets découlant du changement climatique, des mouvements des ravageurs, des nouvelles cultures et des pratiques agricoles sur les populations de ravageurs, la santé végétale, les services écologiques et la biodiversité. L'objectif de cette approche est d'améliorer notre capacité à réagir plus rapidement, de manière flexible et plus efficace afin de limiter au minimum les risques phytosanitaires associés aux ravageurs.

La détection d'une nouvelle espèce de nématode des lésions phytoparasite au Canada, *Pratylenchus alleni*, représente une menace potentielle. Dans ce contexte, la présente étude cherchait à caractériser ce nouveau venu, à déterminer s'il s'agit d'une menace réelle et identifier les outils nécessaires pour y faire face. Dans un premier temps, il était nécessaire de déterminer le spectre d'hôtes de ce ravageur dont le genre est habituellement polyphage. Non seulement cette connaissance permettra de cibler les cultures à risque, mais également de proposer des cultures de rotation à inclure dans un programme de lutte intégrée pour minimiser l'impact de *P. alleni*. Deuxièmement, il était aussi nécessaire de déterminer l'effet des changements climatiques anticipés sur sa reproduction afin de déterminer s'il s'agit d'une

menace immédiate. Par ailleurs, ces informations seront tout à fait inutiles si nous ne sommes pas en mesure de reconnaître et de quantifier la présence de *P. alleni*. Il était donc tout aussi impératif de développer une méthode d'identification rapide.

5.1 Résumé des principaux résultats

La principale contribution de ce mémoire a été d'obtenir de nouvelles connaissances sur la virulence du nématode exotique au Canada, *P. alleni*. Dans les trois projets de recherche présentés dans ce mémoire, de nombreux aspects de ce nématode ont été étudiés. Les principaux résultats sont :

(1) *P. alleni* est polyphage et est favorisé dans un substrat argileux.

En effet, nous avons démontré que ce nématode possède un large spectre d'hôtes incluant le soya, le maïs, la pomme de terre, le millet et le blé. Par contre, nous avons également identifié des cultures comme le trèfle rouge et la luzerne qui ne permettent pas sa reproduction et qui pourront être recommandées afin de limiter les populations de *P. alleni* sous les seuils de dommage. Cependant, les problèmes de nématodes des lésions au Québec étaient surtout répertoriés dans les champs au sol sableux. Une surveillance des autres types de sol devra donc être recommandée.

(2) *P. alleni* sera favorisé par les changements climatiques.

Les régimes climatiques simulant les horizons 2046-2065 (15/26°C et 800 ppm de CO₂) et 2081-2100 (17/28°C et 1200 ppm de CO₂) utilisés dans notre étude ont permis un meilleur

développement du nématode sur le soya comparativement au régime climatique actuel (12/23°C et 400 ppm de CO₂). Ce résultat n'est pas surprenant vu les températures optimales de développement théoriques pour cette espèce. On peut donc s'attendre à voir plus de problèmes liés à ce nématode avec l'augmentation des températures. Par contre, nous avons aussi vu que les températures actuelles n'étaient pas favorables à son développement. Il risque donc de s'écouler encore plusieurs années avant que le climat sous nos latitudes lui soit vraiment favorable.

(3) Les cultivars de soyas résistants aux NKS semblent affecter le développement de *P. alleni*.

Étonnamment, les cultivars S14-M4 et P19T01R possédant respectivement la source de résistance Peking et PI88788 ont démontré un certain potentiel afin de limiter la reproduction de *P. alleni* comparativement au cultivar P90Y90 sensible aux NKS. Ce résultat est difficilement explicable étant donné la haute spécificité de ce mode de résistance pour les NKS et le mode de parasitisme tout à fait différent de *P. alleni*. Il devra être confirmé en utilisant d'autres cultivars résistants et s'assurer que ce n'est pas uniquement causé par le choix des génotypes de soya dans cette étude. Par contre, considérant que ces gènes de résistance risquent d'être déployés dans la majorité des cultivars suite à la découverte du NKS au Québec, il s'agit d'un résultat fort intéressant à creuser.

(4) Il est possible de quantifier simultanément *P. alleni* et *P. penetrans*.

Nous avons développé une méthode permettant de différencier et de quantifier ces deux espèces, et ce, même lorsqu'elles sont présentes dans un même échantillon. Comme ces

deux espèces ont finalement des spectres d'hôtes assez différents, cet outil sera indispensable pour les laboratoires de diagnostic et pour la mise en place de plan de gestion efficace.

5.2 Applications et perspectives futures

Afin de restreindre son établissement vers d'autres régions agricoles et de limiter son impact économique, nous nous devons de poursuivre le suivi des populations de *P. alleni* dans les champs du Québec et de continuer les recherches sur des méthodes de lutte efficaces. La méthode qPCR développée dans ce mémoire assure maintenant une détection rapide et efficace des *P. alleni* extraits du sol et des racines de ses plantes hôtes. Cette méthode est déjà utilisée afin d'assurer le suivi des populations de *P. alleni* au Québec. En effet, au cours de la dernière année, l'équipe de nématologie d'Agriculture et Agroalimentaire Canada a effectué un échantillonnage dans 185 champs. Les résultats de l'essai moléculaire ont démontré que *P. alleni* était présent dans 15 de ces champs alors que *P. penetrans* a été retrouvé dans 83 champs (B. Mimee, communication personnelle). L'établissement de cette espèce au Québec semble donc déjà bien en cours et il faudra prendre des mesures pour en limiter l'impact sur les productions agricoles. La détermination du spectre d'hôtes de *P. alleni* au chapitre 2 permettra donc de suggérer deux cultures, la luzerne et le trèfle rouge, aux producteurs afin de limiter les populations sous les seuils de dommages économiques. Des tests en champs devront être réalisés afin de confirmer que les deux cultures pourraient devenir des cultures de rotation alternatives.

Au cours de recherches futures, il serait aussi intéressant de déterminer l'effet de la présence de *P. alleni* sur d'autres espèces de nématodes de la rhizosphère comme *P. penetrans* ou *Heterodera glycines* qui partagent la même niche écologique et les mêmes ressources nourricières dans l'optique d'évaluer s'il y a compétition pour les ressources. Une conséquence importante de l'établissement d'une espèce exotique dans un nouvel habitat est la possible altération des communautés présentes. En effet, chez les nématodes ravageurs, il y a deux types de compétition qui peuvent être observées : la compétition par exploitation et la compétition par exclusion. La première s'observe si l'une des espèces est capable d'une meilleure exploitation des ressources, soit par un avantage morphologique ou physiologique. Cette compétition entraîne généralement une réponse négative pour l'une des deux espèces (Thomas et Clark, 1983, Eisenback, 1985). Par ailleurs, la compétition par exclusion entraînera également le déplacement d'une espèce par une autre. Ce phénomène d'exclusion compétitive s'observe lorsque deux espèces ne peuvent occuper la même niche écologique. Ainsi, les deux espèces interagissent jusqu'à ce qu'une espèce domine. La domination de cette espèce est souvent reliée à un avantage compétitif qu'elle possède, particulièrement une vitesse de développement plus rapide, une densité initiale plus élevée ou un meilleur pouvoir pathogène sur un hôte particulier (Hardin, 1960; Bongers et Bongers, 1998). Ainsi, la notion de compétition entre *P. alleni* et d'autres phytonématodes pourrait être une avenue de recherche intéressante pour déterminer si *P. alleni* possède un avantage compétitif. Celui-ci pourrait aussi être vérifié dans un contexte de changements climatiques.

Pour conclure, les résultats obtenus mettent à l'avant-plan la pathogénicité de *P. alleni* sur de nombreuses cultures et confirme que ce ravageur pourrait avoir une incidence économique importante. Par conséquent, *P. alleni* sera un ravageur à surveiller de près. De plus, ces résultats ouvrent de nombreuses possibilités pour de futures recherches sur *P. alleni* afin d'en apprendre davantage sur cette espèce exotique.

Bibliographie

- Acosta, N. & R.B. Malek. 1979. Influence of temperature on population development of eight species of *Pratylenchus* on soybean. *Journal of Nematology* 11(3): 229-232.
- Acosta N. & R.B. Malek. 1981. Symptomatology and histopathology of soybean roots infected by *Pratylenchus scribneri* and *P. alleni*. *Journal of Nematology* 13(1): 6-12.
- Adam, M.A.M., M.S. Phillips & V.C. Blok. 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology* 56(1): 190-197.
- Ainsworth, E.A., P.A. Davey, C.J. Bernacchi, O.C. Dermody, E.A. Heaton, D.J. Moore, P.B. Morgan, S.L. Naidu, H. Yoo Ra, X. Zhu, P.S. Curtis & S.P. Long. 2002. A meta-analysis of elevated [CO₂] effects on soybean (*Glycine max*) physiology, growth and yield. *Global Change Biology* 8(8): 695-709.
- Ainsworth, E.A. & S.P. Long. 2005. What have we learned from 15 years of free-air CO₂ enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO₂. *New pathologist* 165(2): 351-372.
- Al-Banna, L., V. Williamson & S.L. Gardner. 1997. Phylogenetic analysis of nematodes of the genus *Pratylenchus* nuclear 26S rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7(1): 94-102.
- Al-Banna L., A.T. Ploeg, V.M. Williamson & I. Kaloshian. 2004. Discrimination of six *Pratylenchus* species using PCR and species-specific primers. *Journal of Nematology* 36(2): 142-146.
- Baker, R. S., C.H. Jarvis, R.J.C. Cannon, A. MacLeod & F.K.A. Walters. 2000. The role of climatic mapping in predicting the potential geographical distribution of non-indigenous pest under current and future climates. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 82: 57-71.
- Bebber, D. P. 2015. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. *Annual review of phytopathology* 53: 335-356.
- Bélair, G., N. Dauphinais, D.L. Benoit & Y. Fournier. 2007. Reproduction of *Pratylenchus penetrans* on 24 common weeds in potato fields in Québec. *Journal of nematology* 39(4): 321-326.

- Bélair, G., B. Mimee, M.O. Duceppe & S. Miller. 2013. First report of the root-lesion nematode, *Pratylenchus alleni* associated with damage on soybean in Quebec, Canada. *Plant Disease* 97(2): 292.
- Bernard, E.C. 1980. Identification, distribution, and plant associations of plant-parasitic nematodes in Tennessee. *University of Tennessee Agricultural Experiment Station Bulletins* 594: 1-18.
- Bernard, E.C. & M.L. Keyserling. 1985. Reproduction of root-knot, lesion, spiral and soybean cyst nematodes on sunflower. *Plant Disease* 69: 103-105.
- Berry, S. D., M. Fargette, V.W. Spaul & P. Cadet. 2008. Detection and quantification of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*), lesion nematode (*Pratylenchus zaeae*) and dagger nematode (*Xiphinema elongatum*) parasites of sugarcane using real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes* 22(3): 168-176.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. 2006. Real-time PCR applications guide.
- Boag, B., J.W. Crawford & R. Neilson. 1991. The effect of potential climatic changes on the geographical distribution of the plant-parasitic nematodes *Xiphinema* and *Longidorus* in Europe. *Nematologica* 37(1): 312-323.
- Bongers, T. & M. Bongers. 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology* 10(3): 239-251.
- Bootsma, A., S. Gameda & D.W. McKenney. 2005. Potential impacts of climate change on corn, soybeans and barley yields in Atlantic Canada. *Revue canadienne de la science du sol* 85(2): 345-357.
- Braun-Kiewnick, A., N. Viaene, L. Folcher, F. Ollivier, G. Anthoine, B. Niere, M. Sapp, B. van de Vossenberg, H. Toktay & S. Kiewnick. 2016. Assessment of a new qPCR tool for the detection and identification of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* by an international test performance study. *European Journal of plant Pathology* 144(1): 97-108.
- Broeders, S., I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens & D. Morisset. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology* 37(2): 115-126.
- Brown, M.J., R.M. Riedel & R.C. Rowe. 1980. Species of *Pratylenchus* associated with *Solanum tuberosum* cv Superior in Ohio. *Journal of Nematology* 12(3): 189-192.

- Bustin, S.A., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele & C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55(4): 611-622.
- Carrasco-Ballesteros, S., P. Castillo, B.J. Adams & E. Pérez-Artés. 2007. Identification of *Pratylenchus thornei*, the cereal and legume root-lesion nematode, based on SCAR-PCR and satellite DNA. *European Journal of plant pathology* 118(2): 115-125.
- Castillo, P. & N. Vovlas. 2007. *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae): diagnosis, biology pathogenicity and management. Nematology Monograph and Perspectives 6 (Series Editors: Hunt, D.J. & Perry, R.N.). Leiden, The Netherlands, Brill Academic Publishers, 529p.
- Caswell, H., F. Reed, S.N. Stephenson & P.A. Werner. 1973. Photosynthetic pathways and selective herbivory: A hypothesis. *The American Naturalist* 107(956): 465-480.
- Chakraborty, S. 2013. Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change. *Global Change Biology* 19(7) : 1985-2000.
- Cheng, X., P. Xie, F. Cheng, R. Xu & B. Xie. 2009. Competitive displacement of the native species *Bursaphelenchus mucronatus* by an alien species *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchida: Aphelenchoididae): a case of successful invasion. *Biol. Invasions* 11(2): 205-213.
- Choshali, A.H., A. Seraji, S. Rezaee, A. Shirinfekr & S.N. Mirghasemi. 2015. The effects of soil organic matter content and soil texture on the population number of *Pratylenchus loosi*, in tea plantation of Iran. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 6(2): 54-62.
- Cook, R. & J.L. Starr. 2006. Resistant cultivars. P. 370-391 *In* R.N. Perry & M. Moens (Éds). Plant nematology. CABI publishing, Oxfordshire, UK.
- Das, D.K., J. Singh & S. Vennila. 2011. Emerging crop pest scenario under the impact of climate change- A brief review. *Journal of Agricultural Physics* 11: 13-20.
- Daulton, R.A.C. & C.J. Nusbaum. 1961. The effect of soil temperature on the survival of root-knot nematodes *Meloidogyne javanica* and *M. hapla*. *Nematologica* 6: 280-294.
- Dauphinais, N., G. Bélair, Y. Fournier & O.P. Dangi. 2005. Effect of crop rotation with grain pearl millet on *Pratylenchus penetrans* and subsequent potato yields in Quebec. *Phytoprotection* 86(3): 195-199.

- De Bruin, J.L. & P. Pedersen. 2008. Response of old and new soybean cultivars to *Heterodera glycines* Ichinohe. *Agronomy Journal* 100(5): 1347-1353.
- De Luca, F., A. Reyes, A. Troccoli & P. Castillo. 2011. Molecular variability and phylogenetic relationships among different species and populations of *Pratylenchus* (Nematoda: Pratylenchidae) as inferred from the analysis of the ITS rDNA. *European Journal of Plant Pathology* 130(3): 415-426.
- Decker, H. 1989. Plant nematodes and their control: Phytonematology. New Delhi, Inde. *Amerind Publishing*. 540p.
- DeLucia, E.H., P.D. Nabity, J.A. Zavala & M.R. Berenbaum. 2012. Climate change: Resetting plant-insect interactions. *Plant physiology* 160(4): 1677-1685.
- Demeure, Y. 1978. Influence des températures élevées sur les états actifs et anhydrobiotiques du nématode *Scutellonema cavenessi*. *Revue de Nématologie* 1(1) : 13-19.
- Deryng, D., D. Conway, N. Ramankutty, J. Price & R. Warren. 2014. Global crop yield response to extreme heat stress under multiple climate change futures. *Environmental Research Letters* 9(3): 1-13.
- Dickerson, O.J., H.M. Darling & G.D. Griffin. 1964. Pathogenicity and population trends of *Pratylenchus penetrans* on potato and corn. *Phytopathology* 54(3): 317-322.
- Dickerson, O.J. 1979. The effects of temperature on *Pratylenchus scribneri* and *P. alleni* populations on soybeans and tomatoes. *Journal of Nematology* 11(1): 23-26.
- Di Vito, M, N. Greco, G. Oreste, M.C. Saxena, K.B. Singh & I. Kusmenoglu. 1984. Plant parasitic nematodes of legumes in Turkey. *Nematologia Medit* 22: 245-251.
- Doucet, M.E., E. Lorenzo, C. Azpilicueta & E. Maero. 2005. Histopathology of *Rubus idaus* roots infected by *Pratylenchus alleni*. *Nematologica Brasileira* 29(2): 311-313.
- Eisenback, J.D. 1985. Interactions among concomitant populations of nematodes (p. 193-213) In J.N. Sasser & C.C. Carter (Éds). An advanced treatise on *Meloidogyne*, vol, 2. Raleigh, NC: North Carolina State University Graphics.
- Elad, Y. & I. Pertot. 2014. Climate change impacts on plant pathogens and plant diseases. *Journal of Crop Improvement* 28(1): 99-139.
- Feng, G., Y. Li & Z. Cheng. 2014. Plant molecular and genomic response to stress in projected futures CO2 environment. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33(1-2): 238-249.

- Ferris, V.R. 1961. A new species of *Pratylenchus* (Nemata-Tylenchida) from roots of soybeans. *Helminthological society* 28(2): 109-111.
- Ferris, V.R. & R.L. Bernard. 1962. Injury to soybean caused by *Pratylenchus alleni*. *Plant Disease Report* 46: 181-184.
- Florini, D.A., R. Loria & J.B. Kotcon. 1987. Influence of edaphic factors and previous crop on *Pratylenchus* spp. population densities in potato. *Journal of Nematology* 19(1): 85-92.
- Forge, T.A., F.J. Larney, L.M. Kawchuk, D.C. Pearson, C.A. Koch & R.E. Blackshaw. 2015. Crop rotation effects on *Pratylenchus neglectus* populations in the root zone of irrigated potatoes in southern Alberta. *Plant Pathology* 37(3): 363-368.
- Fosu-Nyarko, J. & M.G.K. Jones. 2016. Advances in understanding the molecular mechanisms of root lesion nematode host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 54: 11.1-11.26.
- Fourie, H., C. Zijlstra & A.H. McDonald. 2001. Identification of root-knot nematode species occurring in South Africa using the SCAR-PCR technique. *Nematology* 3(7): 675-680.
- Freckman D.W. & E.P. Caswell. 1985. The ecology of nematodes in agroecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 23:275-296.
- Gao, W., T.A. Jackson, G.L. Hartman & T.L. Niblack. 2006. Interactions between the soybean cyst nematode and *Fusarium solani* f. sp. *Glycines* based on greenhouse factorial experiments. *Phytopathology* 96(12): 1409-1415.
- Garrett, K. A., S.P. Dendy, E.E. Frank, M.N. Rouse & S.E. Travers. 2006. Climate change effects on plant disease: genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 44: 489-509.
- GIEC. 2014. Changements climatiques 2014: Incidences, adaptation et vulnérabilité – Résumé à l'intention des décideurs. Contribution du Groupe de travail II au cinquième Rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat [sous la direction de Field, C.B., V.R. Barros, D.J. Dokken, K.J. Mach, M.D. Mastrandrea, T.E. Bilir, M. Chatterjee, K.L. Ebi, Y.O. Estrada, R.C. Genova, B. Girma, E.S. Kissel, A.N. Levy, S. MacCracken, P.R. Mastrandrea et L.L. White]. Organisation météorologique mondiale, Genève (Suisse), 34 p.
- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30(6): 503-512.

- Goto, K., Y.Y. Min, E. Sato & K. Toyota. 2011. A multiplex real-time PCR assay for the simultaneous quantification of the major plant-parasitic nematodes in Japan. *Nematology* 13(6): 713-720.
- Grandison, J.S. & H.R. Wallace. 1974. The distribution and abundance of *Pratylenchus thornei* in fields of strawberry clover (*Trifolium fragiferum*). *Nematologica* 20(3): 283-290.
- Hackney, R.W. & O.J. Dickerson. 1975. Marigold, castor bean, and chrysanthemum as controls of *Meloidogyne incognita* and *Pratylenchus alleni*. *Journal of Nematology* 7(1): 84-89.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.
- Hardin, G. 1960. The competitive exclusion principle. *Science* 131(3409): 1292-1297.
- Heid, C.A., J. Stevens, K.J. Livak & P.M. Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Hillis, D.M. & M.T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66(4): 411-453.
- Hunter, M.D. 2001. Effects of elevated atmospheric carbon dioxide on insect-plant interactions. *Agricultural and Forest Entomology* 3(3): 153-159.
- Institut de la statistique du Québec. 2015. Superficie des grandes cultures, rendement à l'hectare et production, par région administrative, Québec, 2015. [En ligne] http://www.stat.gouv.qc.ca/docs-hmi/statistiques/agriculture/grandes-cultures/gc_2015.htm (page consultée le 17 mars 2016).
- IRDA : Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) -Institut de recherche et de développement en agroenvironnement (IRDA) Numéro du feuillet utilisé : 31G01101. Échelle de numérisation : 1 : 20 000, année de numérisation : 1998-2008. Référence originale : le champ 07 du fichier PAT de la couverture numérique (Beauharnois-Huntingdon, 1954, échelle originale 63360, publié par provincial). [En ligne] <http://www.irda.qc.ca/fr/outils-et-services/informations-sur-les-sols/etudes-pedologiques/feuillets-cartographiques/region-18/> (Carte consultée le 15 avril 2016).
- Jones, J. T., A. Haegeman, E.G.J. Danchin, H.S. Gaur, J. Helder, M.G.K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-lópez, J.E. Palomares-Rius, W.M.L. & R.N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14(9): 946-961.

- Jones, M.G.K. & J. Fosu-Nyarko. 2014. Molecular biology of root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) and their interaction with host plants. *Annals of Applied Biology* 164(2): 163-181.
- Kable, P.F. & W.F. Mai. 1968. Influence of soil moisture on *Pratylenchus penetrans*. *Nematologica* 14(1): 101-122.
- Karssen, G. & M. Moens. 2006. Root-knot nematodes. In Perry, R.N. & M. Moens (Éds.) Plant nematology (Chap. 3, 59-90). Wallingford, U.K.; CABI.
- Klink, V. P., P. Hosseini, M. H. MacDonald, N. W. Alkharouf & B. F. Matthews. 2009. Population-specific gene expression in the plant pathogenic nematode *Heterodera glycines* exists prior to infection and during the onset of a resistant or susceptible reaction in the roots of the *Glycine max* genotype Peking. *BMC Genomics* 10(111): 1-22.
- Klink, V. P., P. Hosseini, P. D. Matsye, N. W. Alkharouf & B. F. Matthews. 2010. Syncytium gene expression in *Glycine max* [PI 88788] roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(2): 176-193.
- Klink, V.P., P.D. Matsy, K.S. Lawrence & G.W. Lawrence. 2013. Engineered soybean cyst nematode resistance. In El-Shemy H.A. (Éd.). Soybean-pest resistance (139-172). Croatie: InTech.
- Krupenikov, I. A., B.P. Boincean & D. Dent. 2011. Soil texture and structure. In de Mulder, E. F. J. & E. Derbyshire (Éds.) The black Earth (Partie 2: 19-25). Pays-Bas: Springer Netherlands.
- Kumari, S. & S.A. Subbotin. 2012. Molecular characterization and diagnostics of stubby root and virus vector nematodes of the family *Trichodoridae* (Nematoda: Triplonchida) using ribosomal RNA genes. *Plant Pathology* 61(6): 1021-1031.
- Lee, T.G., I. Kumar, B.W. Diers & M.E. Hudson. 2015. Evolution and selection of *Rhg1*, a copy-number variant nematode-resistance locus. *Molecular Ecology* 24(8): 1774-1791.
- Lewis, W.J., J.C. van Lentren, S.C. Phatak & J.H. Tumlinson. 1997. A total system approach to sustainable pest management. *National Academy of Sciences* 94: 12243-12248.
- Lewis, K. & C. Witham. 2012. Agricultural commodities and climate change. *Climate Policy* 12: s53-s61.

- Machado, A.C.Z. & J. V. A. Filho. 2016. Broad-sense heritability and variance component estimates for *Pratylenchus brachyurus* resistance in Brazilian soybean genotypes. *Tropical Plant Pathology* 41(6): 390-396.
- Matsuo, É., T. Sedyama, R. D. Oliveira, C.D. Cruz & R. D. C. T. Oliveira. 2012. Characterization of type and genetic diversity among soybean cyst nematode differentiators. *Scientia Agricola* 69(2): 147-151.
- McKenzie, S.W., W.T. Hentley, R.S. Hails, T.H. Jones, A.J. Vanbergen & S.N. Johnson. 2013. Global climate change and above-belowground insect herbivore interactions. *Frontiers in Plant Science* 4(412): 1-6.
- McKeown, A. W. & J. W. Potter. 2001. Yield of 'Superior' potatoes (*Solanum tuberosum*) and dynamics of root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) populations following "nematode suppressive" cover crops and fumigation. *Phytoprotection* 82(1): 13-23.
- McSorley, R. & D.E. Walter. 1991. Comparison of soil extraction methods for nematodes and microarthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34:201-207.
- Mimee, B., H. Peng, V. Popovic, Q. Yu, M.-O. Duceppe, M.-P. Tétreault & G. Bélair. 2014. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) on soybean in the province of Quebec, Canada. *Plant Disease* 98(3): 429.
- Min, Y. Y., K. Toyota & E. Sato. 2012. A novel nematode diagnostic method using the direct quantification of major plant-parasitic nematodes in soil by real-time PCR. *Nematology* 14(3): 265-276.
- Moens, M. & R. N. Perry. 2009. Migratory plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence. *Annual Review of Phytopathology* 47(1): 313-332.
- Mokrini, F., L. Waeyenberge, N. Viaene, F. Abbad Andaloussi & M. Moens. 2013. Quantitative detection of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*, using qPCR. *European Journal of Plant Pathology* 137(2): 403-413.
- Neher, D.A. 2010. Ecology of plant and free-living nematodes in natural and agricultural soil. *Annual Review of Phytopathology* 48: 371-394.
- Niblack, T.L. 1992. *Pratylenchus*, *Paratylenchus*, *Helicotylenchus*, and others nematodes on soybean in Missouri. *Journal of Nematology* 24(4S): 738-744.
- Niblack, T.L., A.L. Colgrove, K. Colgrove & J.P. Bond. 2008. Shift in virulence of soybean cyst nematode is associated with use of resistance from PI 88788. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2008-0118-01-RS.

- Norton, D.C., L.R. Frederick, P.E. Ponchillia & J.W. Nyhan. 1971. Correlations of nematodes and properties in soybean fields. *Journal of Nematology* 3(2): 154-163.
- Norton, D.C. 1989. Abiotic soil factors and plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 13: 299-307.
- Oliveira, C.M.G., A.R. Monteiro & V.C. Blok. 2011. Morphological and molecular diagnostics for plant-parasitic nematodes: working together to get identification done. *Tropical Plant Pathology* 36(2): 065-073.
- Olthof, T.H.A. & J.W. Potter. 1973. The relationship between population densities of *Pratylenchus penetrans* and crop losses in summer-maturing vegetables in Ontario. *Phytopathology* 63: 577-582.
- Olthof, T.H.A. 1987. Effects of fumigants and systemic pesticides on *Pratylenchus penetrans* and potato yield. *Journal of Nematology* 19: 424-430.
- Osborne, T., G. Rose & T. Wheeler. 2013. Variation in the global-scale impacts of climate change on crop productivity due to climate model uncertainty and adaptation. *Agricultural and Forest Meteorology* 170: 183-194.
- Ouranos. 2015. Vers l'adaptation. Synthèse des connaissances sur les changements climatiques au Québec. Édition 2015. Montréal, Québec : Ouranos. 415p.
- Peng, Y. & M. Moens. 2003. Host resistance and tolerance to migratory plant-parasitic nematodes. *Nematology* 5(2): 145-177.
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. In Bustin S.A (Éd.) A-Z quantitative PCR (Chap. 3, 87-112). La Jolla, Ca. É.-U.: IUL Biotechnology.
- Poddar, S.K. 2003. Detection and discrimination of *B. pertussis* and *B. holmesii* by real-time PCR targeting IS481 using a beacon probe and probe-target melting analysis. *Molecular and Cellular probes* 17(2-3): 91-98.
- Poitras, E. & A. Houde. 2002. Le PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2(2): 2-11.
- Polley, L.R. 2015. Foodborne parasite and climate change: possible impacts and challenges. In Gajadhar, A.A. (Éd.) Foodborne parasites in the food supply web: occurrence and control (Chap. 3, 23-47). Sawston, Cambridge, U.K.; Elsevier.

- Potter, J.W. & T.H.A. Olthof. 1974. Yield losses in fall-maturing vegetables relative to population densities of *Pratylenchus penetrans* and *Meloidogyne hapla*. *Phytopathology* 64(8): 1072-1075.
- Potter, J. W. & A. W. McKeown. 2003. Nematode biodiversity in Canadian agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 83(3): 289-302.
- Qian, B., R. De Jong, S. Gameda, T. Huffman, D. Neilsen, R. Desjardins, H. Wang & B. McConkey. 2013. Impact of climate change scenarios on Canadian agroclimatic indices. *Canadian Journal of Soil Science* 93 (2): 243–259.
- Rios, A.D.F., M.R. da Rocha, A.S. Machado, K.A.G.B. Avila, R.A. Teixeira, L. de Castro Santos & L.R.S. Rabelo. 2016. Host suitability of soybean and corn genotypes to the root lesion cause by nematode under natural infestation conditions. *Ciência Rural* 46(4): 580-584.
- Robbins, R.T., R.D. Riggs & D. Von Steen. 1987. Results of annual phytoparasitic nematode surveys of Arkansas soybean fields, 1978-1986. *Annals of applied nematology* 1: 50-55.
- Robbins, R.T., R.D. Riggs & D. Von Steen. 1989a. Phytoparasitic nematode surveys of Arkansas cotton fields, 1986-88. *Supplement to Journal of nematology* 21(4S): 619-623.
- Robbins R.T., R.D. Riggs & D. Von Steen. 1989b. Phytoparasitic nematodes surveys of Arkansas wheat fields, 1986-88. *Supplement to Journal of nematology*. 21(4S): 624-628.
- Rodrigues, D.B., C.R. Dias-Arieira, M.V.V. Vedoveto, M. Roldi, H.F.D. Molin & V.H.F. 2014. Crop rotation for *Pratylenchus bachyurus* control in soybean. *Nematropica* 44(2): 146-151.
- Rosenzweig, C. & F.N. Tubiello. 2007. Adaptation and mitigation strategies in agriculture: an analysis of potential synergies. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 12(5): 855-873.
- Rutledge, R.G. & C. Côté. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research* 31(16): e93.
- Sato, E., Y.Y. Min, T. Shirakashi, S. Wada & K. Toyota. 2007. Detection of root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans* (Cobb), in a nematode community using real-time PCR. *Japanese Journal of Nematology* 37(2): 87-92.
- Sato, E., Y. Suga, C. Kisaki, K. Toyota, K. Miyake, A. Takada, K. Takeuchi & R. Matsuura. 2011. Quantification of *Pratylenchus penetrans* in radish fields using a combination method of soil compaction and real-time PCR to determine the economic threshold. *Soil science and plant nutrition* 57(2): 213-220.

- Sauvion, N, P.A. Calatayude, D. Thiéry & F. Marion-Poll. 2013. Interactions insects-plantes. *Quae. IRD Éditions*. Marseille, France. 784 p.
- Sayler, R.J., C. Walker, F. Goggin, P. Agudelo & T. Kirkpatrick. 2012. Conventional PCR detection and real-time PCR quantification of reniform nematode. 2012. *Plant Disease* 96(12): 1757-1762.
- Schmitt, D.P. & K.R. Barker. 1981. Damage and reproductive potentials of *Pratylenchus barchyurus* and *P. penetrans* on soybean. *Journal of Nematology* 13(3): 327-332.
- Seguin, B. 2010. Le changement climatique : conséquences pour les végétaux. *Quaderni. Communication, technologies, pouvoir* 71 : 27-40.
- Seinhorst, J. W. 1950. De betekenis van de toestand van de grond voor het optreden van aantasting door het stengelaaltje (*Ditylenchus dipsaci* (Kühn) Filipjev). *European Journal of Plant Pathology* 56(5) : 289-348.
- Seinhorst, J.W. 1959. Two new species of *Pratylenchus*. *Nematologica* 4:83-86.
- Seinhorst, J.W. 1965. The relation between nematode density and damage to plants. *Nematologica* 11: 137-154.
- Siddiqi, M.R. 2000. Tylenchida: Parasites of plants and insects. (2e édition, 833 pages). Royaume-Uni: CAB International.
- Sigma Aldrich. 2008. Sigma qPCR Technical Guide. <http://www.gene-quantification.de/SIAL-qPCR-Technical-Guide.pdf>.
- Singh, S.P. & V.K. Jain. 1984. Two new species of the genus *Pratylenchus* Filipjev, 1936 from Lucknow (abstract). *Bulletin of Entomology* 25(2): 179-185.
- Singh, S.K., M. Hodda, G.J. Ash & N.C. Banks. 2013a. Plant-parasitic nematodes as invasive species: characteristics, uncertainty and biosecurity implications. *Annals of Applied Biology* 163(3): 323-350.
- Singh, S.K., M. Hodda & G.J. Ash. 2013b. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *EPPO Bulletin* 43(2): 334-374.
- Somasekhar, N. & J.S. Prasad. 2012. Plant-nematode interactions: Consequences of climate change. In Venkateswarlu, B., Shanker, A.K., Shanker, C. & Maheswari, M. (Éds). Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies (Chap. 17, p.547-564). Houten, Pays-Bas: Springer Netherlands.

- Starr, J.L., R. Cook & J. Bridge. 2002. Plant resistance to parasitic nematodes. CABI Publishing. UK.
- Statistiques Canada. 2015. Table 001-0010 - Estimated areas, yield, production and average farm price of principal field crops, in metric units, annual, CANSIM (database). [En ligne]
<http://www5.statcan.gc.ca/cansim/a26?lang=eng&retrLang=eng&id=0010010&&pattern=&stByVal=1&p1=1&p2=31&tabMode=dataTable&csid=> (Pages consultées le 16 mars 2016).
- Stetina, S.R., J.S. Russin & E.C. McGawley. 1997. Replacement series: A tool for characterizing competition between phytoparasitic nematodes. *Journal of Nematology* 29(1): 35-42.
- Subbotin, S.A., A. Vierstraete, P. De Ley, J. Rowe, L. Waeyenberge, M. Moens & J.R. Vanfleteren. 2001. Phylogenetic relationships within the cyst-forming nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(1): 1-16.
- Subbotin, S.A., E.J. Ragsdale, T. Mullens, P.A. Roberts, M. Mundo-Ocampo & J. G. Baldwin. 2008. A phylogenetic framework for root lesion nematodes of the genus *Pratylenchus* (Nematoda): Evidence from 18S and D2–D3 expansion segments of 28S ribosomal RNA genes and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48(2): 491-505.
- Svec, D., A. Tichopad, V. Novosadova, M.W. Pfaffl & M. Kubista. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* 3: 9-16.
- Szalanski, A.L., D.D. Sui, T.S. Harris & T.O. Powers. 1997. Identification of cyst nematodes of agronomic and regulatory concern with PCR-RFLP of ITS1. *Journal of Nematology* 29(3): 255-267.
- Tarte, R. & W.F. Mai. 1976. Morphological variation in *Pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* 8(3): 185-195.
- Teklu, M.G., B.H. Meressa, E. Radtke, T.H. Been & J. Hallmann. 2016. Damage thresholds and population dynamics of *Pratylenchus penetrans* on carrot (*Daucus carota* L. cv. Nerac) at three different seed densities. *European Journal of Plant Pathology* 145 (886): 1-11.
- Terashima, I., S. Yanagisawa & H. Sakakibara. 2014. Plant responses to CO₂: background and perspectives. *Plant and Cell Physiology* 55(2): 137-140.

- Thies J.A., A.D. Petersen & D.K. Barnes. 1995. Host suitability of forage grasses and legumes for root-lesion nematode *Pratylenchus penetrans*. *Crop Science* 35(6): 1647-1651.
- Thomas R.J. & C.A. Clark. 1983. Effects of concomitant development on reproduction of *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis* on sweet potato. *Journal of Nematology* 15(2): 215-221.
- Thompson, J.P., T.G. Clewett, J.G. Sheedy, R.A. Reen, M.M. O'Reilly & K.L. Bell. 2010. Occurrence of root-lesion nematodes (*Pratylenchus thornei* and *P. neglectus*) and stunt nematode (*Merlinus brevidens*) in the northern grain region of Australia. *Australasian Plant Pathology* 39(3): 254-264.
- Thuzar, M., A.B. Puteh, N.A.P. Abdullah, M.B.M. Lassim & K. Jusoff. 2010. The effects of temperature stress on the quality and yield of soya bean [*Glycine max* L.) Merrill.]. *Journal of Agricultural Science* 2(1):172-179.
- Townshend, J. L. 1963. A modification and evaluation of the apparatus for the Oostenbrink direct cottonwool filter extraction method1). *Nematologica* 9(1) : 106-110.
- Townshend, J.L. 1972. Influence of edaphic factors on penetration of corn roots by *Pratylenchus penetrans* and *P. minyus* in three Ontario soils. *Nematologica* 18: 201-212.
- Townshend, J.L. & C.R. Weber. 1971. Movement of *Pratylenchus penetrans* and the moisture characteristics of three Ontario soils. *Nematologica* 17: 47-57.
- Townshend, J.L., J.W. Potter & C.B. Willis. 1978. Ranges of distribution of species of *Pratylenchus* in northeastern North America. *Inventaire des maladies des plantes du Canada* 58(4) : 80-82.
- Townshend, J.L. 1984. Anhydrobiosis in *Pratylenchus Penetrans*. *Journal of Nematology* 16(3): 282-289.
- Toyota, K., T. Shirakashi, E. Sato, S. Wada & Y.Y. Min. 2008. Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Soil Science and Plant Nutrition* 54(1): 72-76.
- Trudgill, D.L. 1991. Resistance and tolerance of plant parasitic nematodes in plants. *Annual Review of Phytopathology* 29: 167-192.
- Tse C. & J. Capeau. 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 61(3) : 279-293.

- Van der Berg, E. & P. Cadet. 1992. On five plant parasitic tylenchs from Martinique (Nemata). *Fundamental and Applied Nematology* 15: 431-442.
- Vu, J.C.V., R.W. Gesch, A.H. Pennanen, L.H. Allen, Jr., K.J. Boote & G. Bowes. 2001. Soybean photosynthesis, Rubisco, and carbohydrate enzymes function at supraoptimal temperatures in elevated CO₂. *Journal of Plant physiology* 158: 295-307.
- Waeyenberge, L., N. Viaene & M. Moens. 2009. Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans*. *Nematology* 11(6): 847-857.
- Wallace, H.R. 1966. The influence of moisture stress on the development, hatch and survival of eggs of *Meloidogyne javanica*. *Nematologica* 12: 57-69.
- Walther, G., A. Roques, P.E. Hulme, M.T. Sykes, P. Pysek, I. Kuhn, M. Zobel, S. Bacher, Z. Botta-Dukat, H. Bugmann, B. Czucz, J. Dauber, T. Hickler, V. Jarosik, M. Kenis, S. Klotz, D. Minchin, M. Moora, W. Nentwig, J. Ott, V.E. Panov, B. Reineking, C. Robinet, V. Semchenko, W. Solarz, W. Thuiller, M. Vilà, K. Vohland & J. Settele. 2009. Alien species in a warmer world: risks and opportunities. *Trends in ecology & evolution* 24(2): 686-693.
- Wang, F., A.C. Puddy, B.C. Mathis, A.G. Montalvo, A.A. Louis, J.L. McMackin, J. Xu, Y. Zhang, C.Y. Tan, T.L. Schofield, J.J. Wolf & J.A. Lewis. 2005. Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency. *Vaccine* 23(36): 4500-4508.
- Wartman F.S. & E.C. Bernard. 1985. Reproduction of *Pratylenchus alleni* (Nematoda) on soybean and other field and vegetable crops. *Tennessee Farm & Home Science* 35: 3-5.
- Whitehead, A.G. & J.R. Hemming. 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Annals of Applied Biology* 55: 25-38.
- Williams, D.D. 1982. The known *Pratylenchidae* (Nematoda) of Iowa. *Iowa State Journal of Research* 564: 419-424.
- Williams, J., P. Taylor, P. Bogacki, M. Pallotta, S. Bariana & H. Wallwork. 2002. Mapping of the root lesion nematode (*Pratylenchus neglectus*) resistance gene *Rlnn1* in wheat. *Theoretical and Applied genetics* 104(5): 874-879.
- Williamson, V.M. & A. Kumar. 2006. Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in genetics* 22(7): 396-403.

- Yamori, W., K. Hikosaka & D.A. Way. 2014. Temperature response of photosynthesis in C3, C4 and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research* 119(1-2): 101-117.
- Yan, G., R.W. Smiley, P. A. Okubara, A. Skantar, S.A. Easley, J.G. Sheedy & A. L. Thompson. 2008. Detection and discrimination of *Pratylenchus neglectus* and *P. thornei* in DNA extracts from soil. *Plant disease* 92(11): 1480-1487.
- Yan, G., R.W. Smiley & P.A. Okubara. 2012. Detection and quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA extracted from soil using real-time PCR. *Phytopathology* 102(1): 14-22.
- Yan, G., R.W. Smiley, P.A. Okubara, A.M. Skantar & C.L. Reardon. 2013. Developing a real-time PCR assay for detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* in soil. *Plant Disease* 97(6): 757-764.
- Ye, W. & R.M. Giblin-Davis. 2013. Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLoS ONE* 8(11): e78804.
- Yu, Q. 2008. Species of *Pratylenchus* (nematoda: *Pratylenchidae*) in Canada: Description, distribution, and identification. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30(3): 477-485.
- Yu, Y. T., Liu, H. L., Zhu, A. G., Zhang, G., Zeng, L. B., & Xue, S. D. 2012. A review of root lesion nematode: Identification and plant resistance. *Advances in Microbiology* 2(4): 411-416.
- Zasada, I.A., J.E. Weiland, Z. Han, T.W. Walters & P. Moore. 2015. Impact of *Pratylenchus penetrans* on establishment of red raspberry. *Plant Disease* 99(7): 939-946.
- Ziska, L. H. & McConnell, L. L. 2015. Climate change, carbon dioxide, and pest biology: Monitor, mitigate, manage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64(1) : 6-12.
- Zivakparvar, M.E., D.C. Norton & P. Cox. 1980. Population increase of *Pratylenchus hexincisus* on corn as related to soil temperature and type. *Journal of nematology* 12(4): 313-318.
- Zunke, E. 1990. Observations on the invasion and endoparasitic behavior of the root lesion nematode *pratylenchus penetrans*. *Journal of Nematology* 22(3): 309-320.

